



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

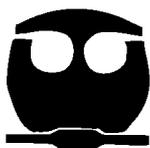
EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO  
(HSP) DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA  
FRACCIÓN 25-35 DE LA PROTEÍNA AMILOIDE- $\beta$  EN  
CEREBRO DE RATA: IMPLICACIONES EN LA  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

**Tesis**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**LILIANA LICEA GONZÁLEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Marina Gavilanes Ruiz
Vocal	Prof. Raquel Ortega Muñoz
Secretario	Prof. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca
1er. Suplente	Prof. Armando Muñoz Comonfort
2º. Suplente	Prof. José Ignacio Páramo Ramírez

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Enfermedades Neurodegenerativas del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez"

Asesor del tema:

Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca.

---

Sustentante:

Liliana Licea González.

---

## *Agradecimientos*

*A mis padres: Ignacio Licea y Elvira González, por brindarme un hogar cálido y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos.*

*A mi hermano, Joel Licea por su amistad sincera y apoyo incondicional.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México por ofrecerme la oportunidad de asumir el reto de convertirme en profesionista.*

*A mi director de Tesis, Dr. Jorge Guevara por su generosidad al brindarme la oportunidad de realizar este trabajo.*

*A los miembros del jurado, por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis y por los valiosos consejos, sugerencias, y acertados aportes.*

*A todos los integrantes del Laboratorio de enfermedades neurodegenerativas, por su calidez, sugerencias, confianza y sobre todo por su calidad humana y personal.*

*Al Doctor Daniel Limón, por su valiosa colaboración.*

*A todos mis profesores, por sus enseñanzas y porque con gran capacidad y dedicación me impulsaron en todo momento.*

*A mis amigos, por los buenos momentos compartidos, por acompañarme en momentos importantes, por su cariño, comprensión y constante estímulo, por su calidez y compañerismo al compartir inquietudes, éxitos y fracasos.*

*Adriana C, Alfredo H, Cecilia R, Eduardo R, Mario F, Mayra H, Noemí G, Óscar A, Susana Padrón, Pilar S y todos aquellos que me acompañaron.*

*Les tengo que agradecer su apoyo incondicional y sus ánimos constantes. ¡Gracias!.*

# ÍNDICE

---

CONTENIDO	Página
<b>Abreviaturas</b>	iv
<b>Glosario</b>	iv
<b>I. Resumen</b>	1
<b>II. Introducción</b>	2
2.1 Breve recuento histórico	2
2.2 Definición de la enfermedad de Alzheimer	2
2.3 Importancia	3
2.4 Progresión y diagnóstico	4
2.5 Factores de riesgo	5
2.6 Tratamiento	5
2.7 Genética	6
2.8 Hallazgos patológicos más importantes	7
2.8.1 Placas seniles	7
2.8.2 Amiloide- $\beta$	8
2.8.3 Desde la APP a la Amiloide- $\beta$	8
2.8.4 Marañas neurofibrilares	10
2.9 Teorías sobre la Enfermedad de Alzheimer	10
2.9.1 Radicales libres	10
2.9.2 Hipótesis de la cascada amiloide	10
2.9.3 Alteraciones en los sistemas neurotransmisores	11
2.10 La memoria	12
2.11 El hipocampo	12
2.12 Proteínas de choque térmico	14
2.12.1 Nomenclatura y clasificación básica	15
2.12.2 Funciones biológicas	15
2.12.3 HSP como chaperonas moleculares	16
2.12.4 HSP en la degradación de proteínas	16
2.12.5 HSP en condiciones de estrés	16
2.12.6 HSP 90	18
2.12.7 HSP 70	18
2.12.8 HSP 60	19
2.12.9 HSP 27	19
2.12.10 Regulación genética	19
2.12.11 Efecto protector en el sistema nervioso	20
<b>III. Justificación</b>	22
<b>IV. Objetivos</b>	23
<b>V. Hipótesis</b>	23
<b>VI. Materiales y métodos</b>	24
6.1 Material biológico	24
Estrategia experimental	25
6.2 Método	26
6.3 Anticuerpos utilizados	27
<b>VII. Resultados</b>	29
7.1 Alteraciones morfológicas	29
7.2 Cerebros administrados sólo con anestesia	29
7.3 Anti-HSP 27	31

7.4	Anti-HSP 60	32
7.5	Anti-HSP 70	34
7.6	Anti-HSP 90	36
7.7	Anti-GFAP	38
<b>VIII.</b>	<b>Discusión</b>	<b>41</b>
<b>IX.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>47</b>
<b>X.</b>	<b>Apéndice</b>	<b>48</b>
<b>XI.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>55</b>

## RESUMEN

La pérdida de memoria es una de las mayores amenazas para el cerebro que envejece, ya que, si bien a cualquier edad pueden aparecer enfermedades cerebrales que causan fallas de memoria, éstas son más frecuentes en los adultos mayores.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el más común de los procesos neurodegenerativos que se relacionan con el envejecimiento, se presenta en todos los grupos de la sociedad, y aunque es más común entre personas mayores de 60 años, pueden padecerla personas más jóvenes.

Los cerebros de los pacientes con enfermedad de Alzheimer presentan a nivel histopatológico dos tipos de acumulaciones proteicas aberrantes que provocan la muerte neuronal: las placas neuríticas y las marañas neurofibrilares. Las placas neuríticas (PNs) compuestas en su periferia por prolongaciones neuronales y en su parte central por fibras del polipéptido amiloide- $\beta$  se sitúan en el espacio extracelular del neuropilo central donde ejercen efectos tóxicos directos sobre las neuronas. Además atraen y activan células gliales que segregan sustancias citotóxicas y amplifican los daños tisulares. Todo ello conduce a alteraciones del citoesqueleto neuronal, y a la formación de marañas neurofibrilares (MNFs) formadas por pares de filamentos helicoidales plegados de proteína tau.

Ya se ha demostrado que la fracción 25-35 del amiloide- $\beta$  es neurotóxica y causa neurodegeneración en estructuras como el hipocampo y la corteza cerebral, estructuras implicadas en los procesos de aprendizaje y memoria.

Recientemente, se han descrito un conjunto de proteínas llamadas Proteínas de choque térmico o Heat Shock Proteins (HSP) y se ha sugerido que pueden tener cierta participación en la protección neuronal. Se encuentran en todas las células, algunas en forma constitutiva en pequeñas cantidades, ya que funcionan como chaperonas moleculares y el estrés aumenta su producción; otras sólo se sintetizan en condiciones de estrés para proteger a las proteínas que se sintetizan a partir de ese momento y facilitan la restauración de las proteínas dañadas. En caso de que el daño sea irreparable, entregan las proteínas dañadas a las proteasas para que sean degradadas. Las HSP se clasifican en familias según su peso molecular y se han descrito diferentes funciones para cada familia.

# INTRODUCCIÓN

## 2.1 BREVE RECUENTO HISTÓRICO

En 1906 Alois Alzheimer (1864-1915) patólogo y psiquiatra alemán presentó un trabajo en el que se recogía simultáneamente el curso clínico y el estudio anatomopatológico del cerebro de una mujer llamada "Aguste D.", que a los 51 años, había presentado pérdida de memoria, desorientación, alucinaciones, y demencia que la llevaron a su muerte a los 56 años en un estado de demencia avanzada. El estudio mostró que su corteza cerebral era más estrecha de lo normal (estaba atrófica) y, además, que existían dos tipos de anomalías que hoy en día siguen siendo las características histopatológicas principales de la Enfermedad de Alzheimer, señalando que la paciente padecía una enfermedad diferente a las demencias descritas anteriormente, Alzheimer publicó sus hallazgos, con amplios detalles clínicos y dibujos de las lesiones cerebrales con el título "Sobre una enfermedad específica de la corteza cerebral" (Alzheimer A. Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozess der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin*. 1907; 64:146-148). Fue Kraepelin, maestro de Alzheimer, quien le dio el nombre de enfermedad de Alzheimer (Graeber 1999; Fuentes 2003).

## 2.2 DEFINICIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad crónica, neurodegenerativa que afecta especialmente a las áreas asociativas corticales y parte del sistema límbico, especialmente las regiones importantes para la memoria. Según la Clasificación Internacional de las Enfermedades (CIE-10, Clasificación Internacional de las Enfermedades, 10ª Edición, OMS 1994 -25), se define como un síndrome debido a una enfermedad degenerativa cerebral primaria, de etiología desconocida y que presenta rasgos neuropatológicos y neuroquímicos característicos, en la que hay déficit de múltiples funciones corticales superiores que repercuten en la actividad cotidiana del enfermo (Organización Mundial de la Salud. CIE10 1992).

Se caracteriza por un deterioro progresivo e irreversible de las funciones cerebrales superiores o cognitivas, con pérdida de memoria, juicio y lenguaje, es decir, clínicamente se manifiesta como una demencia (Guimerà *et al.*, 2002).

Su impacto depende en parte de las características de la persona antes de la enfermedad tales como personalidad, condición física y estilo de vida. Aunque variable, la duración promedio de la enfermedad es entre 7 y 10 años (Donoso 2003; Martínez y Pascual, 2003).

### **2.3 IMPORTANCIA**

Pocos diagnósticos en medicina traen consigo más angustia y desaliento a pacientes y familias que el Alzheimer, enfermedad que va lentamente quitando al individuo sus cualidades más humanas como son: memoria, juicio, atención, concentración y lenguaje (Donoso 2003; Martínez y Pascual, 2003).

El incremento de las expectativas de vida en el mundo en las últimas décadas ha propiciado un incremento en la proporción de individuos que presentan enfermedades de las etapas tardías de la vida. Destaca la EA como una de las más importantes, así como los requerimientos de servicios de salud para su atención, al ser un problema de orden médico, psiquiátrico, neurológico, epidemiológico social y económico (Soto 2002).

La EA se ha convertido en uno de los problemas prioritarios de salud a nivel internacional y en este proceso México no es la excepción, se prevé que la demanda de servicios de salud mental será mayor debido al envejecimiento de la población y, en particular, que los casos de la EA mostrarán la mayor prevalencia (Soto 2002).

Se estima que un 10 % de los individuos de 65 años padecen algún grado de esta enfermedad, y esta cifra se incrementa paulatinamente con la edad, alcanzando un valor cercano al 50 % para la población mayor de 85 años.

La EA se presenta en un 90 % en su forma esporádica, en la que los pacientes no tienen antecedentes familiares de la enfermedad y al parecer no hay modificación del material genético que sea responsable de su manifestación, mientras que la forma hereditaria representa sólo en un 10 % de los casos (Carpio 2000; Martínez y Pascual, 2003).

Según la edad de inicio, la EA puede ser presenil (temprana), una forma rara y muy agresiva de la enfermedad, y que es debida principalmente a mutaciones genéticas, o senil (tardía) que se considera de origen desconocido, aunque es el tipo más común y de progresión más lenta (Donoso 2003; Martínez y Pascual, 2003).

## 2.4 PROGRESIÓN Y DIAGNÓSTICO

La progresión clínica viene definida por un curso lento y progresivo. En la fase preclínica hay algunos problemas cognitivos y síntomas depresivos leves poco frecuentes, pero conforme la enfermedad avanza hay modificaciones del comportamiento y la personalidad, después hay pérdida de la memoria episódica reciente y una disminución en la capacidad de retención de nuevos recuerdos, alteraciones del lenguaje y trastornos del sueño. Los pacientes precisan ayuda para todas sus necesidades básicas, pierden por completo la orientación en el tiempo y espacio además del reconocimiento de personas. La etapa terminal es un estado de desconexión total del medio externo, estupor y rigidez generalizada. Los pacientes fallecen por debilitamiento progresivo y complicaciones asociadas (Donoso 2003; Martínez y Pascual, 2003).

El diagnóstico no es fácil, y pueden pasar meses o incluso años antes de que se realice, ya que existe un solapamiento de síntomas con otros trastornos mentales y síntomas del envejecimiento normal y la única forma de establecer el diagnóstico con certeza es el examen anatomopatológico del cerebro en la autopsia mediante métodos basados en el estudio del sitio y número de lesiones características y su relación con la edad (Martínez y Pascual, 2003).

El diagnóstico *in vivo* es tanto clínico como por exclusión de cualquier otra causa de demencia. Para obtener el diagnóstico de "posible Alzheimer" normalmente se emplean tests psicológicos que miden las dificultades de atención, percepción, memoria y resolución de problemas además de habilidades sociales y verbales (Martínez y Pascual, 2003).

Además de las pruebas psicológicas se emplean nuevas técnicas y pruebas que tratan de poner de manifiesto alteraciones bioquímico-funcionales de la enfermedad, tales como la resonancia magnética, la tomografía de emisión de positrones y la tomografía de emisión de fotones simples además del electroencefalograma y la tomografía axial computarizada (Guimerà *et al.*, 2002; Martínez y Pascual, 2003).

Otras técnicas de diagnóstico buscan "marcadores genéticos" (mutaciones puntuales en los genes que codifican ciertas proteínas implicadas en la enfermedad), o "Marcadores bioquímicos", aunque aún no se ha encontrado un marcador con características ideales, están siendo utilizados cuantificación de proteína tau (fosforilada y no fosforilada), proteína  $\beta$ -amiloide,

proteína precursora de amiloide (APP), factores neurotróficos y apolipoproteína E (Řípová and Strunecka 2001; Guimerà *et al.*, 2002; Martínez y Pascual, 2003).

## 2.5 FACTORES DE RIESGO

La EA se considera de origen multifuncional, con predisposición genética e influencia de ciertos factores de los que destacan los siguientes:

### •Edad

Es el principal factor de riesgo. La incidencia de EA dibuja una función exponencial a partir de los 65 años, y se duplica cada 5 años aproximadamente (Barranco- Quintana *et al.*, 2005).

### •Factores genéticos

Con respecto a la EA de tipo familiar o temprana, se consideran de importancia mutaciones en los genes que codifican para la APP y las presenilinas (implicadas en el metabolismo de APP), mientras que en la enfermedad de tipo esporádica o tardía, se considera como factor de riesgo el gen que codifica para la Apolipoproteína E 4.

Hay que destacar que las mutaciones en la APP y presenilinas son determinantes, en cambio, los polimorfismos de la APO E son probabilísticos (Barranco- Quintana *et al.*, 2005).

### •Otros factores de riesgo

Aunque de menor importancia, se ha encontrado que la hipertensión arterial, el abuso de alcohol, tabaquismo, traumatismos cráneo-encefálicos, bajo nivel educativo, diabetes, hormonas sexuales y dieta son factores de riesgo en mayor o menor grado.

El caso de las hormonas sexuales es especialmente interesante, ya que se ha encontrado que mujeres posmenopáusicas que siguen una terapia hormonal sustitutiva mediante estrógenos muestran una menor incidencia de Alzheimer (Marder and Sano 2000; Barranco- Quintana *et al.*, 2005).

## 2.6 TRATAMIENTO

Actualmente no se busca un “medicamento milagroso” que pueda curar el Alzheimer. Las estrategias de tratamiento deben incluir el tratamiento de los síntomas cognoscitivos y no cognoscitivos y pueden ser de tipo farmacológico o no farmacológico (Carpio 2000; Grau-Veciana 2006).

La mayoría de los fármacos utilizados o en fase de desarrollo tienen como objetivo prevenir la neurodegeneración, hacer más lenta la progresión de la enfermedad, compensar las alteraciones funcionales y mantener al enfermo en condiciones de que pueda llevar a cabo sus necesidades básicas de la vida diaria de la mejor manera y durante el mayor tiempo posible, si bien el uso de fármacos trae consigo importantes efectos secundarios (Carpio 2000; Grau-Veciana 2006). Entre los que se están utilizando actualmente están los fármacos colinérgicos, vitaminas C y E, Ginkgo Biloba, flavonoides, anti-inflamatorios no esteroideos y estrógenos además de antipsicóticos, benzodiacepinas, anticonvulsivos y antidepresivos (Praticò and Delanty 2000; Bastianetto and Quirion 2002).

Los tratamientos que se consideran preventivos como el consumo de alimentos y suplementos ricos en antioxidantes y flavonoides aún no demuestran plenamente su eficacia y seguridad (Muñoz 2001; Bastianetto and Quirion 2002; Grau-Veciana 2006).

## **2.7 GENÉTICA**

Con respecto a la EA de tipo familiar, los cromosomas 21, 14 y 1 son el foco de atención, ya que se han encontrado mutaciones en ciertos genes de estos cromosomas. Estos genes defectuosos parecen acelerar la formación de las placas de A $\beta$  y la apoptosis (Menéndez *et al.*, 2002) al producirse proteínas anormales, las cuales están implicadas en el metabolismo de la amiloide- $\beta$  (A $\beta$ ).

En la EA de inicio tardío, no hay un patrón genético claro, lo que sugiere que en su patogenia intervienen factores genéticos y ambientales. Entre los factores genéticos, el único que se ha implicado de forma constante es el gen de la Apolipoproteína E (ApoE) en el cromosoma 19. La Apo E es una lipoproteína que interviene en los mecanismos de reparación de las neuronas, además es esencial para el catabolismo de los ácidos grasos (Barranco- Quintana *et al.*, 2005; Carpio 2000).

Se conocen 3 isoformas de esta proteína llamados E2, E3, y E4. Cada una de ellas, está codificada por los alelos e2, e3 y e4. Aunque todavía no se sabe exactamente cómo el alelo e4 de Apo E aumenta el riesgo de Alzheimer (Guimerà *et al.*, 2002).

## **2.8 HALLAZGOS PATOLÓGICOS MÁS IMPORTANTES**

El cerebro de los pacientes con EA se atrofia, lo que se traduce en una pérdida de peso y volumen con una mayor separación entre las circunvoluciones y aumento de la profundidad de los surcos (Guimerà *et al.*, 2002).

Microscópicamente, la enfermedad se caracteriza por lesiones neuropatológicas características: las placas seniles y las marañas neurofibrilares. Estas lesiones se localizan preferentemente en las áreas asociativas corticales y parte del sistema límbico, especialmente las regiones importantes para la memoria, donde se observa una pérdida selectiva de neuronas. A pesar de que con el envejecimiento es normal la presencia en un cierto grado de estas alteraciones, los cerebros de los pacientes de Alzheimer los tienen en un grado mucho mayor (Martínez y Pascual, 2003).

### **2.8.1 PLACAS SENILES**

Las placas seniles son lesiones de estructura esferoide formadas en su mayor parte por la proteína A $\beta$  de 40 y 42 residuos en estructura fibrilar, y de otras sustancias incluyendo varias proteínas de fase aguda, factores del complemento, proteoglicanos, apolipoproteína E4 y citocinas, entre otras. Constan de una región central de amiloide rodeada por astrocitos reactivos, microglía y neuritas distróficas (dendritas y axones degenerados) y miden aproximadamente 20-100  $\mu\text{m}$  de diámetro (Edelstein-Keshet and Spiros 2002; Morgan *et al.*, 2004).

Se han descrito varios subtipos de placas: Placas seniles difusas, que se asocian a envejecimiento normal y se considera que no son tóxicas sobre las células del sistema nervioso, placas seniles primitivas que representan los cambios morfológicos más tempranos en la secuencia patogénica de la EA, placas seniles clásicas (neuríticas), que están presentes en los estados más avanzados de la enfermedad, y placas quemadas que representan el estado terminal de la evolución de una placa particular en la que ha desaparecido el componente celular (no contienen neuritas anómalas asociadas) (Cruz *et al.*, 1997; Guimerà *et al.*, 2002).

### **2.8.2 AMILOIDE- $\beta$**

El A $\beta$  es un péptido de 39 a 42 aminoácidos que es a su vez un fragmento de la llamada proteína precursora del amiloide (APP). Los dos tipos más importantes de A $\beta$ , son denominados amiloide- $\beta$  1-40 y amiloide- $\beta$  1-42 según el número de aminoácidos presentes. Inicialmente se asumió que el péptido A $\beta$  únicamente se producía en situaciones patológicas, pero ya se ha demostrado que su producción y secreción es un acontecimiento fisiológico normal (Kar *et al.*, 2004; Morgan *et al.*, 2004).

### 2.8.3 DESDE LA APP HASTA LA AMILOIDE- $\beta$

La APP es una proteína transmembranal de 770 aminoácidos cuyo gen se encuentra codificado en el cromosoma 21. Es una proteína que pareciera ser importante para ayudar al crecimiento y la supervivencia de las neuronas, se la ha relacionado con la adhesión celular, el metabolismo de proteínas, y la homeostasis del Ca<sup>2+</sup>.

La APP es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso, glicosilada en el aparato de Golgi y transportada hacia la membrana en donde se inserta, quedando la porción que contiene a la A $\beta$  parcialmente incluida en la membrana (Muñoz, 2001).

La APP puede experimentar un metabolismo diverso generando como productos finales A $\beta$  u otros fragmentos. En la vía metabólica no-amiloidogénica, una enzima llamada  $\alpha$ -secretasa corta la APP dentro de la región del amiloide liberando extracelularmente un fragmento llamado CT83 o APPas. Una segunda enzima, la  $\gamma$ -secretasa corta y libera la parte carboxilo terminal de la proteína produciendo un fragmento de 3kD denominado p3 que se degrada. Esta vía prevalece en condiciones normales de la neurona.

En la vía amiloidogénica, la enzima  $\beta$ -secretasa corta a la APP por el extremo N-terminal de la secuencia peptídica del A $\beta$ , la  $\gamma$ -secretasa corta en el extremo C-terminal de la secuencia produciéndose entonces la liberación del A $\beta$ . El punto de corte de estas secretasas varía, dando lugar a un A $\beta$  de 39 a 42 aminoácidos. La forma más común, relativamente soluble, tiene 40 aminoácidos, mientras que otras formas de 42 residuos son mucho menos solubles que las primeras (Selkoe and Shenk 2003; Götz *et al.*, 2004; Kar *et al.*, 2004).

La relativa utilización de una u otra vía de4 metabolismo de la molécula parece estar parcialmente determinado por el tipo de célula, su estado de diferenciación, la acción de ciertas

cinasas, hormonas esteroideas, neurotransmisores muscarínicos o inhibición de fosfatasa (Varadarajan *et al.*, 2000; Muñoz 2001; Morgan *et al.*, 2004; Von Bernhardt 2005).

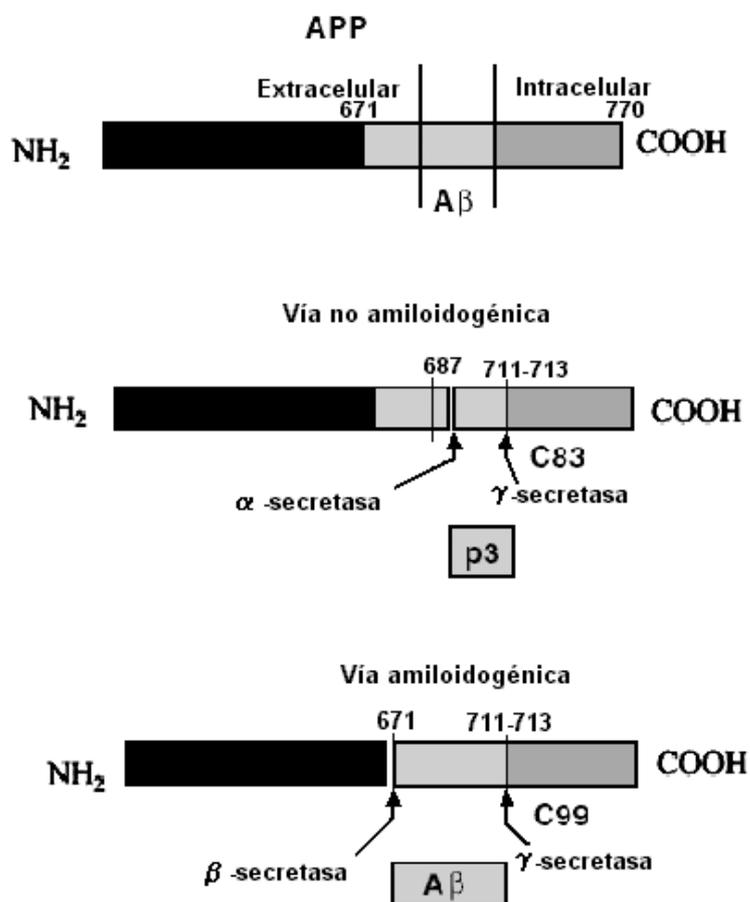


Fig. 1 Estructura y vías metabólicas de APP (Martínez y Pascual, 2003).

Todavía no está claro el mecanismo mediante el cual los depósitos de A $\beta$  producen daño celular, se han propuesto diversas teorías: activación de la microglía, activación de la respuesta inflamatoria, liberación de citocinas neurotóxicas, produciendo daño oxidativo (Miranda *et al.*, 2000; Butterfield *et al.*, 2001), induciendo mecanismos de apoptosis (Joseph *et al.*, 2001; Kar *et al.*, 2004), además el A $\beta$  se une a metales, lo que induce un cambio conformacional hacia lámina  $\beta$ -plegada, resultando en un aumento de su agregación (Varadarajan *et al.*, 2000). Por otro lado, niveles altos de A $\beta$  se asocian con niveles bajos de acetilcolina, fundamental para la

memoria y el aprendizaje, además daña los canales iónicos, responsables de la transmisión del impulso nervioso (Miranda *et al.*, 2000; Butterfield *et al.*, 2001; Götz *et al.*, 2004).

#### **2.8.4 MARAÑAS NEUROFIBRILARES**

Al igual que los depósitos de amiloide, constituyen una de las características histológicas más importantes de la EA. Las marañas neurofibrilares son acumulaciones intracelulares formados por parejas de filamentos helicoidales apareados (PHFs), compuestos principalmente por la proteína tau hiperfosforilada de manera anormal y asociada a microtúbulos neuronales dañados. Son considerados un signo de degeneración citoesquelética debido a la edad y una lesión inespecífica de la EA (Guimerà *et al.*, 2002).

En las neuronas, tau normalmente estabiliza los microtúbulos, siendo esencial para el transporte y la función neuronal, pero en el Alzheimer, la proteína tau está hiperfosforilada anormalmente, lo que impide su asociación normal con los microtúbulos, empieza a formar pareja con otras hebras de tau, formando acúmulos (Martínez y Pascual, 2003).

### **2.9 TEORIAS SOBRE LA EA.**

#### **2.9.1 Radicales libres**

Las características del cerebro pueden hacerlo especialmente sensible al daño oxidativo producido por el envejecimiento normal y la agregación de A $\beta$ . Con el transcurso del tiempo, el daño por radicales libres se puede acumular en las neuronas, causando pérdida de la función y muerte. En el caso del Alzheimer son importantes los radicales libres H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el NO producidos en el proceso inflamatorio producido por activación de la microglía (Praticò and Delanty 2000; Butterfield *et al.*, 2002; Chong *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2006).

#### **2.9.2 Hipótesis de la cascada amiloide**

Esta hipótesis es la defendida mayoritariamente en la comunidad científica. Postula que diversos factores dan lugar, directa o indirectamente a cambios en la estabilidad o agregación del péptido A $\beta$  (Morgan *et al.*, 2004; Wirths *et al.*, 2004; Tanzi and Bertram 2005).

El acúmulo gradual de A $\beta$  agregado, pone en marcha una cascada compleja de eventos con activación local de astrocitos y microglía, y liberación de citocinas y proteínas de fase aguda

(Wirhth *et al.*, 2004; Tanzi and Bertram 2005). A través de estos cambios inflamatorios o bien a través de neurotoxicidad directa del péptido A $\beta$ , se produce una lesión local de neuronas que experimentan cambios metabólicos, incluyendo formación de placas neuríticas y marañas neurofibrilares. Asimismo, se inducen alteraciones en la homeostasis del calcio y un daño oxidativo a través de la formación de radicales libres en neuronas y glía. El resultado es la pérdida de neuronas con el consiguiente déficit de neurotransmisores y la aparición de los síntomas clínicos de demencia (Muñoz 2001; Joseph *et al.*, 2001; Martínez y Pascual, 2003; Walsh and Selkoe 2004).

### **2.9.3 Alteraciones en los sistemas neurotransmisores**

Las neuronas mayormente afectadas son las neuronas colinérgicas, cuyo neurotransmisor es la acetilcolina, lo que da lugar a la hipótesis colinérgica (Auld *et al.*, 2002; Guimerà *et al.*, 2002; Kar *et al.*, 2004; Manzano-Palomo *et al.*, 2006).

Uno de los efectos de la EA es la respuesta inflamatoria, donde es importante la enzima ciclooxigenasa (COX) y sus productos, las prostaglandinas. Los niveles excesivos de estos productos incrementan los niveles de glutamato, un neurotransmisor utilizado por las células piramidales de la corteza cerebral y el hipocampo pero, en grandes cantidades es muy tóxico para las mismas, al desencadenar una cascada que termina con la entrada masiva de calcio en la célula (Gazulla 2006).

Otros sistemas neurotransmisores disminuidos son el serotoninérgico, noradrenérgico, y dopaminérgico. Todos ellos tienen papeles reguladores en las células corticales. Los circuitos neuronales implicados en el aprendizaje y memoria son los más intensamente lesionados, principalmente las conexiones del hipocampo, el núcleo basal de Meynert y la corteza entorrinal (Martínez y Pascual, 2003; Manzano-Palomo *et al.*, 2006).

Probablemente, la contribución relativa de cada uno de los mecanismos expuestos es diferente para distintos individuos. Esto explicaría por qué las evidencias apuntan a la participación de múltiples factores.

## **2.10 LA MEMORIA**

La memoria es un proceso neurocognitivo que nos permite registrar, codificar, consolidar, almacenar, acceder y recuperar cuando sea necesario, la información que recibimos (Ostrosky 1998).

La memoria inmediata es la capacidad para mantener en la mente una experiencia durante algunos segundos, la memoria a corto plazo puede durar segundos o minutos y la memoria a largo plazo permanece durante semanas, meses o incluso toda la vida.

En función de la naturaleza de los recuerdos existen la memoria implícita, no declarativa o de procedimiento, que se refiere a las sensaciones, capacidades y habilidades que se recuerdan de modo inconsciente y la memoria explícita o declarativa, que se refiere a hechos, personas, lugares o cosas que se recuerdan mediante un esfuerzo consciente y deliberadamente (Passig 1994; Fernández y López 1998).

Han sido propuestos varios modelos para explicar cómo funciona la memoria declarativa, pero se coincide en afirmar que este proceso se inicia a partir del registro y procesamiento de los estímulos externos (Prado 1998), la memoria es almacenada en las sinapsis y para formar nuevos recuerdos es necesario modificar las existentes, por ello, cada vez que un concepto o evento es registrado en el cerebro, se forman vínculos sinápticos entre las diferentes áreas de asociación cortical y el hipocampo (Eichenbaum 2003).

Cuando una experiencia es evocada, estimula las sinapsis entre el hipocampo y la corteza, generando una serie de señales que promueven el fortalecimiento, o consolidación de la memoria (Eichenbaum 2004). Este proceso implica la síntesis activa de proteínas que transforman de manera permanente la arquitectura sináptica. En el caso de la memoria, el principal mediador de estos procesos es el glutamato (Alcaraz y Guma 2001).

## **2.11 EL HIPOCAMPO**

El hipocampo es la estructura fundamental para el almacenamiento de la memoria explícita, se considera como la parte del cerebro donde se lleva a cabo el proceso de consolidación, participa en la detección de estímulos novedosos y se relaciona con la memoria espacial episódica (Amaral 1993). Es afectado por factores como estrógenos y estrés y protagoniza enfermedades de la memoria.

Se le relaciona con la corteza cerebral y se ubica al interior del lóbulo temporal. Se caracteriza por presentar una capa principal de neuronas, la capa de las células piramidales, en la cual se distinguen cuatro regiones, llamadas CA1 a CA4. Se le incluye en el sistema llamado formación hipocámpica (Amaral and Witter, 1989). Además, desde el punto de vista funcional es considerado dentro del sistema límbico, el cual coordina las respuestas emocionales participando en los procesos implicados en la memoria, el aprendizaje, la motivación y el comportamiento (Desmond and Moore 1982).

Los estímulos procedentes de las áreas de asociación cortical que llegan a la formación hipocámpica, deben ingresar en el circuito que integra: **corteza entorrinal -- giro dentado -- CA3 -- CA1 -- subiculum -- corteza entorrinal**, en donde se producen los cambios de fortalecimiento sináptico, esenciales para llevar a cabo el fenómeno de consolidación de la memoria (Alcaraz y Guma 2001).

Aferencias y eferencias nerviosas. Las aferencias hacia el hipocampo proceden de la corteza entorrinal, el septum y el hipocampo contralateral. También recibe aferencias del tronco del encéfalo, tálamo, hipotálamo y amígdala. Las eferencias del hipocampo salen principalmente a través del fórnix y del área CA1 (Fernández 1996).

Diversos neurotransmisores se encuentran en la formación hipocámpica: el glutamato, el GABA, la acetilcolina, la noradrenalina, la dopamina y la serotonina, también se detectan la encefalinas, endorfinas, somatostatina, histamina, adenosina, etc. (Fernández 1996).

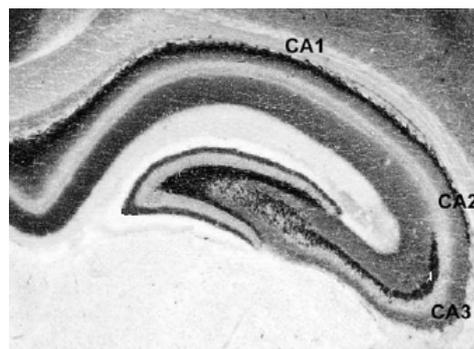


Fig. 2 Microfotografía de una sección cerebral del hipocampo de ratón donde se señalan las regiones CA1, CA2 y CA3. (tomado de [www.upo.es](http://www.upo.es))

## 2.12 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSP)

Fueron descubiertas en 1962 por F. M. Ritossa (Ritossa F 1962), pero no fue sino hasta 1974 que A. Tissieres descubrió los genes de choque térmico, éstos codifican para ciertas familias de proteínas a las que llamó proteínas de choque térmico que son conocidas en general como HSP por sus siglas en inglés (heat shock proteins) (Tissieres *et al.*, 1974).

Aunque inicialmente fueron estudiadas como respuesta al choque térmico, otros estudios han demostrado que la sobre expresión de HSP es debida a muchos otros factores tales como cambios en: temperatura o pH, además de factores como acidosis, presencia de sustancias químicas tóxicas, especies reactivas de oxígeno, etc. (Lindquist and Craig 1988; Kopeček *et al.*, 2001; Papp *et al.*, 2003).

Las proteínas, moléculas centrales en todos los procesos biológicos, deben tener una conformación tridimensional determinada (estructura terciaria), de no ser así, pueden no tener actividad o incluso provocar la muerte celular y diversas enfermedades si no son degradadas, por lo que se considera de gran relevancia el estudio de los mecanismos de su plegamiento y degradación (Imaizumi *et al.*, 2001; Barral *et al.*, 2004).

Las condiciones estresantes para un organismo particular son aquellas que salen de las fluctuaciones normales que enfrenta ese organismo. El estrés puede generar cambios en la estructura tridimensional de las proteínas, causando su desnaturalización (Feder 1999; Jiménez *et al.*, 2006).

La respuesta al estrés y la transcripción de HSP son fenómenos que se han observado a través de la evolución en todos los organismos, lo que habla de la importancia biológica de las HSP. Están presentes en todas las células (Lindquist and Craig 1988), de tal forma que el aumento en la síntesis de estas proteínas se correlaciona con la respuesta y resistencia de los organismos al estrés (Feder 1999), permitiendo que la célula sobreviva bajo condiciones ambientales desfavorables (Donati *et al.*, 1990).

### 2.12.1 Nomenclatura y clasificación básica

Aunque Tissieres introdujo el término “heat shock proteins” (Tissieres *et al.*, 1974) debido a las circunstancias del descubrimiento, actualmente ese término es usado sólo como referencia histórica, ya que el nombre lógico sería “proteínas de estrés”, sin embargo se ha generalizado la abreviatura “HSP” para referirse a las que se producen en condiciones de estrés y “hsc” (heat sock cognates) para las formas constitutivas.

El criterio determinante para la clasificación de las HSP es su peso molecular (Lindquist and Craig 1988), y homología secuencial y funcional (Jaattela and Wissing 1992).

Aunque aún hay controversia en cuanto a la clasificación de las familias en general se pueden nombrar las siguientes: HSP 110, HSP 100, HSP 90, HSP 70, HSP 60, HSP 40, HSP 27, HSP 10 y HSP de bajo peso molecular, donde el número representa la masa molecular aproximada en KDa.

### 2.12.2 Funciones Biológicas

Aunque durante condiciones estresantes la síntesis de HSP se incrementa considerablemente, hay muchas HSP que son expresadas como proteínas constitutivas y juegan un papel importante a lo largo de la vida de las células como chaperonas moleculares y receptores de hormonas entre otras funciones (Harboe and Quayle 1991).

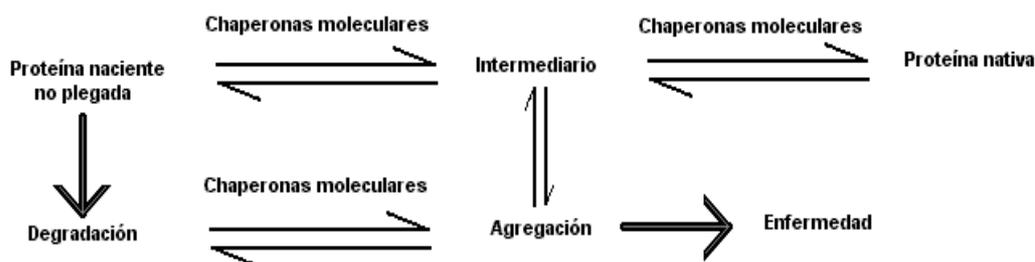


Fig. 3 Relación entre el plegamiento de las proteínas y la enfermedad (Welch and Gambetti 1998).

### **2.12.3 HSP como chaperonas moleculares**

La importancia de las proteínas chaperonas está en el papel que juegan al asistir en el plegamiento de las proteínas hasta su conformación nativa: una vez iniciada la síntesis en los ribosomas, se unen moléculas de HSP a las regiones hidrofóbicas expuestas para evitar agregados e impidiendo la unión de otras moléculas, también es importante su función en el transporte a través de los organelos celulares (Sharp 1999), este proceso se lleva a cabo mediante la unión de la chaperona a la proteína en durante la translocación. La liberación del polipéptido del otro lado de la membrana requiere de la hidrólisis de ATP (Becker and Craig 1994; Sherman and Goldberg 2001). Otra función importante es ayudar a la estabilización y replegamiento correcto de proteínas parcialmente desnaturalizadas.

Para cumplir con su función estas HSP están asociadas con otras HSP de menor peso molecular, que en este caso funcionan como cochaperonas (Hartl 1996; Martin and Hartl 1997; Sherman and Goldberg 2001).

Las proteínas chaperonas se clasifican en dos tipos:

Clase 1, mantienen desplegada la proteína, evitando que interaccione con otras.

Clase 2, contribuyen al plegamiento correcto.

### **2.12.4 HSP en la degradación de proteínas**

Tanto las células normales como las estresadas tienen la necesidad de degradar proteínas que por algún motivo no tienen su conformación correcta y no pueden ser reparadas. Las HSP tienen un papel importante en la degradación de estas proteínas (Buriel *et al.*, 1992; Peters 1994).

### **2.12.5 HSP en condiciones de estrés**

Las situaciones de estrés provocan alteraciones en las proteínas e inducen su desnaturalización. Si esto no se evita, las proteínas desnaturalizadas dejarán de funcionar, formarán agregados y eventualmente contribuirán a la muerte de la célula. La expresión de HSP incluye miembros de las familias HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 y HSP de bajo peso molecular.

Los estudios en bacterias han demostrado que en condiciones desfavorables, las HSP protegen a las proteínas que se sintetizan a partir del momento del daño, también son capaces de estabilizar a las proteínas que han sido dañadas, participan de su renaturalización, y si la proteína tiene un daño extremo se le unen y la entregan a proteasas para que sean degradadas (Sigler *et al.*, 1998; Gavilán *et al.*, 2006).

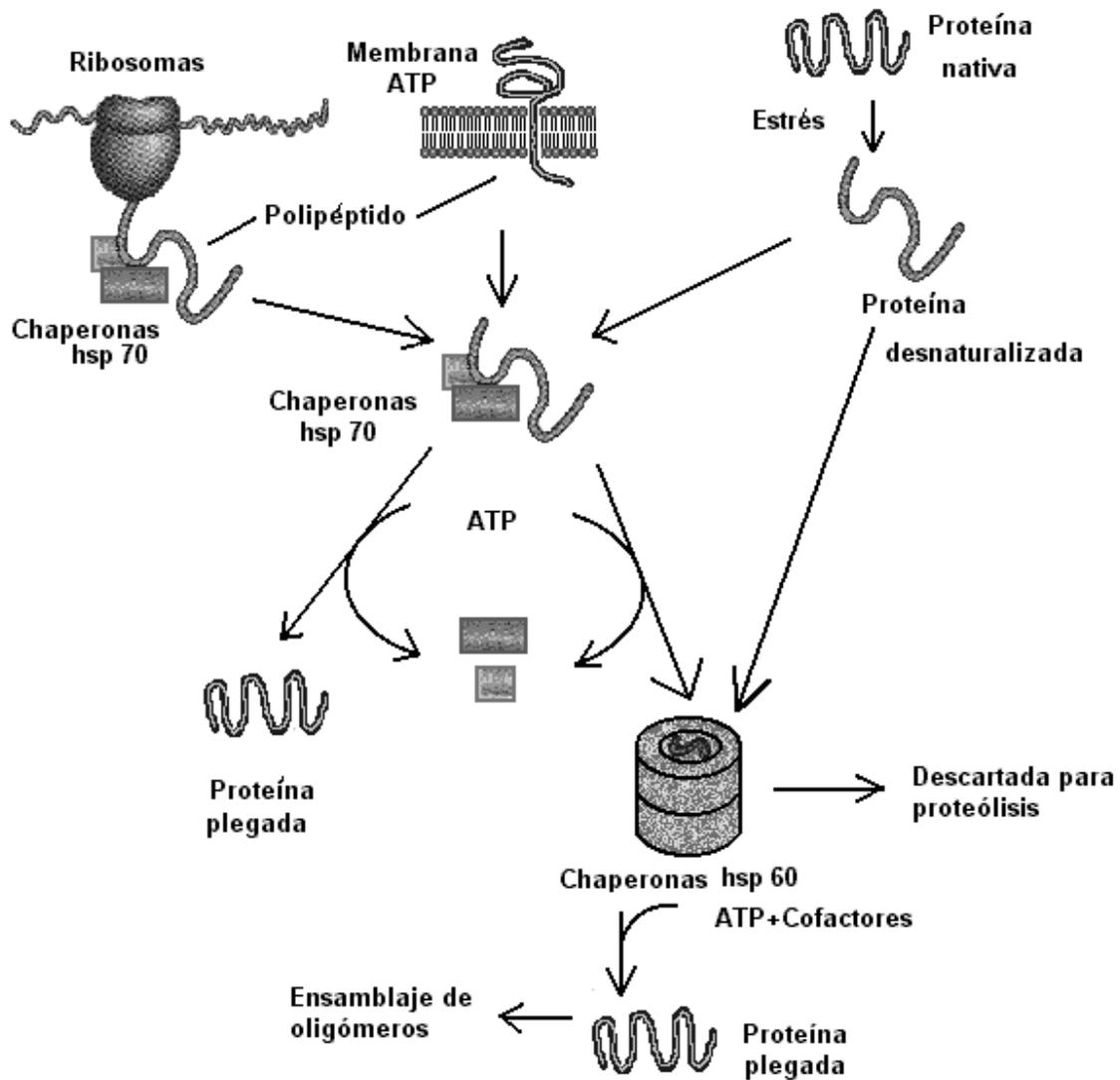


Fig. 4 Funciones de las HSP (Valpuesta *et al.*, 2000).

### **2.12.6 HSP 90**

Una familia muy conservada evolutivamente. Es la proteína citosólica más abundante en células eucariotes aunque las condiciones no sean de estrés. Son constitutivas e inducibles. Bajo condiciones normales se encuentra en asociación con varias proteínas intracelulares incluyendo p23, actina y tubulina, varias cinasas y algunos receptores de proteínas (Barral *et al.*, 2004). Juega un importante papel en la señalización y además tiene función como chaperona al evitar la agregación de proteínas (Caplan 1999), además su forma inducible por el estrés reduce la selectividad por sus sustratos y adopta el papel de compartimento de almacenaje para proteínas dañadas. Actúa asociada con HSP 70 y con inmunofilinas como cochaperonas (Wiech *et al.*, 1992; JaKob and Buchner 1994). Aunque la unión HSP90-proteína es independiente de ATP, la liberación de la proteína sustrato requiere hidrólisis de ATP.

El papel de HSP 90 tiene un interés significativo en la regulación de receptores hormonales, ya que ocupa el sitio de la hormona en el receptor hasta que esta se una (Lebeau and Baulieu 1994).

### **2.12.7 HSP 70**

También es una familia muy conservada evolutivamente. En eucariotes se encuentra en el núcleo, citosol, retículo endoplásmico y las mitocondrias (Becker and Craig 1994).

Son constitutivas e inducibles, chaperona de clase I, protegen proteínas nacientes, transportan proteínas a través de las membranas, reparan y ensamblan proteínas desplegadas y coadyuvan a la degradación de proteínas (Craig 1993; Becker and Craig 1994; Fink 1999; Sharp 1999).

Se pueden asociar con otras proteínas cochaperonas como HSP40, HSP60 o bag-1 y de ello depende su función protectora o de degradación.

La estructura de las HSP 70 incluyen un dominio N-terminal con actividad de ATPasa que se une a sus cochaperonas y un dominio C-terminal capaz de unirse a los residuos hidrofóbicos de los péptidos (Feige and Polla 1994; Palleros *et al.*, 1994), las HSP 60 los introducen en la cavidad central de su anillo heptamérico que tiene una estructura similar a un barril, lo que forma una cámara de aislamiento dentro de la cual se coloca la proteína a medio plegar, ya ahí dentro se le facilita a la proteína su plegamiento, quedando protegidas de los efectos de las

enzimas proteolíticas ( Hass 1995; Ellis and Hartl 1996). HSP 70 es estimulada por su cochaperona HSP 40 para aumentar su actividad (Michels *et al.*, 1997).

#### **2.12.8 HSP 60**

Es una familia integrada por proteínas constitutivas e inducibles. En eucariotes se encuentran principalmente en las mitocondrias y en menor cantidad en el citosol. Su función principal es ser chaperonas, pero tienen un papel significativo en la restauración de proteínas dañadas (Bukau and Horowich 1998; Wirth *et al.*, 2002; Arrigo 2005). Requieren la colaboración de otras chaperonas de clase II, HSP 70 y HSP10, además su funcionamiento es dependiente de ATP (Becker and Craig 1994). Su estructura consiste en un complejo de 2 anillos heptaméricos los cuales forman un cilindro con actividad de ATPasa. En la cavidad central que forman, se pueden unir proteínas a medio plegar. La unión de ATP provoca la rotación de las subunidades, entonces hay un cambio conformacional coordinado por HSP10 que cierra la cavidad con la proteína adentro, proporcionando un medio adecuado para el correcto plegamiento (Ranson *et al.*, 1998).

#### **2.12.9 HSP 27**

Es una familia de chaperonas independientes de ATP, constitutivas e inducibles. Se encuentran en el citoplasma y en el núcleo (Wirth *et al.*, 2002). En condiciones de estrés impiden la agregación de proteínas y protegen frente a la polimerización. Tienen un dominio C-terminal que está involucrado en la formación de oligómeros que reorganizan complejos cuando la célula es expuesta a estrés (Barral *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la sobre expresión de HSP27 protege a las neuronas contra la apoptosis (Latchman 2004). Esta función se asocia con la activación de la proteína p38 que estabiliza la actina, lo que a su vez estabiliza a los microfilamentos e impide su polimerización y agregación (Renkawek *et al.*, 1993; Ohtsuka and Suzuki 2000; Latchman 2004).

#### **2.12.10 Regulación genética**

Durante el estrés, la transcripción de los genes que codifican para las HSP se ve incrementada hasta 100 veces. En eucariotes, los genes de respuesta al estrés son controlados por elementos de choque térmico (HSE) y factores de choque térmico (HSF) presentes en la región del promotor de los genes de choque térmico. La inducción está regulada por retroalimentación

negativa, de tal manera que al asociarse las HSP con HSF1 inhiben la transcripción (Morimoto 1999).

La producción de las HSP se inicia por la acción de los factores de transcripción conocidos como HSF1 y HSF2: con algún factor estresante, el HSF1 se une a un segmento determinado de ADN para inducir la síntesis de las HSP. En condiciones normales, en cambio, la producción de las pequeñas cantidades de HSP es inducida por el HSF2 (Srinivas and Swamynathan 1996).

### **2.12.11 Efecto protector en el sistema nervioso**

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las HSP son producidas ante estímulos dañinos, y su sobreproducción se ha relacionado con efectos protectores, evitando incluso la apoptosis. Se ha demostrado también que el efecto protector de las diferentes HSP puede variar dependiendo del estímulo y el tipo celular, por ejemplo HSP27 tiene un efecto protector más efectivo que HSP70 en el sistema nervioso (Latchman 2004).

Además se ha demostrado que la producción de HSP se encuentra dañada en organismos envejecidos (Söti and Csermely 2002); donde la acumulación de proteínas dañadas es pronunciada (Macario and Conway 2002; Gavilán *et al.* 2006).

El estrés oxidativo lleva a la producción masiva de HSP, ya que durante el daño oxidativo y los procesos inflamatorios están implicadas varias HSP que se encargan de mantener la homeostasis redox de la célula (Arrigo, 2005).

En enfermedades neurodegenerativas, la homeostasis redox se ve severamente dañada, la cantidad de proteínas dañadas se incrementa, por lo cual se requiere una gran cantidad de HSP para arreglar el daño conformacional. Además las HSP han sido localizadas en placas neuríticas y marañas neurofibrilares (Hamos *et al.*, 1991; Pérez *et al.*, 1991; Cisse *et al.*, 1993; Renkawek *et al.*, 1993).

Se ha postulado que las HSP pueden proteger contra las enfermedades neurodegenerativas en modelos animales, ya que pueden convertir proteínas de conformaciones dañinas a formas normales, además pueden prevenir la formación de intermediarios prefibrilares o acelerar su degradación (Ohtsuka and Suzuki 2000; Muchowski, 2002).

Las HSP participan en el intento de secuestrar al péptido A $\beta$  y otras proteínas dañadas (Hamos *et al.*, 1991). Sin embargo el daño crónico agota la inducción y las proteínas dañadas se acumulan (Morimoto, 1999).

En algunos modelos *in vitro* se ha encontrado que HSP70 y HSP90 promueven la solubilización de agregados de tau y la unión de ésta a los microtúbulos, además HSP 70 y HSP 90 reducen la fosforilación de tau (Dou *et al.*, 2003).

**Tabla 1. Localización y funciones de las HSP.**

FAMILIA DE HSP	LOCALIZACIÓN EN LA CÉLULA	FUNCIÓN PRINCIPAL
HSP 110	Núcleo, nucleolo y citoplasma	Implicada en la respuesta a factores estresantes en especial el calor.
HSP 90	Citoplasma y núcleo	chaperona molecular, modula receptores de esteroides, transducción de señales
HSP 70	Citoplasma y núcleo	Chaperona molecular, se asocia con proteínas durante la translocación intracelular y a proteínas desnaturalizadas después del estrés.
HSP 60	Mitocondrias y RE	Chaperona molecular, facilita el replegamiento y ensamble de proteínas.
HSP 40	RE	Chaperona especializada para el colágeno, cochaperona de HSP 70
HSP 27	Citoplasma y núcleo	Chaperona molecular independiente de ATP como respuesta al estrés, participa en la polimerización de actina.
HSP 10	Mitocondrias y RE	Cochaperona de HSP 60
HSP de bajo peso molecular	citoplasma	Degradación de proteínas, dependiente de ATP

## JUSTIFICACIÓN

Estudios anteriores indican la participación de la proteína A $\beta$  en el daño a las neuronas durante la EA (Butterfield *et al.*, 2001; Butterfield *et al.*, 2002). Hay estudios que indican que la fracción 25-35 de este péptido causa neurotoxicidad importante y es por tanto causante del daño neuronal (Stepanichev *et al.*, 2003; Stepanichev *et al.* 2004).

Ya que se ha observado que el daño neuronal se manifiesta primero en la zona del giro dentado del hipocampo (Walsh and Selkoe 2004), los experimentos diseñados en este estudio plantearon la administración unilateral de la fracción 25-35 de la proteína A $\beta$  agregada en esta zona por medio de cirugía estereotáxica para posteriormente estudiar cambios en la morfología y en la cantidad de proteínas de choque térmico sintetizadas a dos diferentes tiempos después de la administración, así como la activación del sistema inmune, evaluada mediante la detección de la activación de la microglía (Cisse *et al.*, 1993; Cuevas 2003).

Con estos experimentos, se pretende tener un modelo animal que podría aclarar parte de la respuesta neuronal para tratar de revertir los daños que se presentan como consecuencia de la presencia de la fracción 25-35 de la proteína A $\beta$  agregada.

El estudio bioquímico molecular de las alteraciones patológicas presentes en la EA sigue siendo clave para comprender la patogenia de esta enfermedad (Selkoe and Shenk 2003; Donoso 2003; Von Bernhardt 2005).

## OBJETIVOS

### Objetivo general:

- Evaluar la producción de las HSP de 27, 60, 70 y 90 KDa tras la administración de la fracción 25-35 de la proteína A $\beta$  en el hipocampo de rata.

### Objetivos particulares:

- Evaluar el efecto de la fracción 25-35 de la proteína amiloide- $\beta$  administrada en el hipocampo de rata, después de 8 horas sobre la producción de las HSP estudiadas.
- Evaluar el efecto de la fracción 25-35 de la proteína amiloide- $\beta$  administrada en el hipocampo de rata, después de 24 horas sobre la producción de las HSP estudiadas.
- Estudiar el efecto de la fracción 25-35 de la proteína amiloide- $\beta$  administrada en el hipocampo de rata en la activación de la microglía.

## HIPÓTESIS

La administración de la fracción 25-35 de la proteína amiloide- $\beta$  en hipocampo de ratas produce cambios morfológicos sobre las células piramidales del hipocampo.

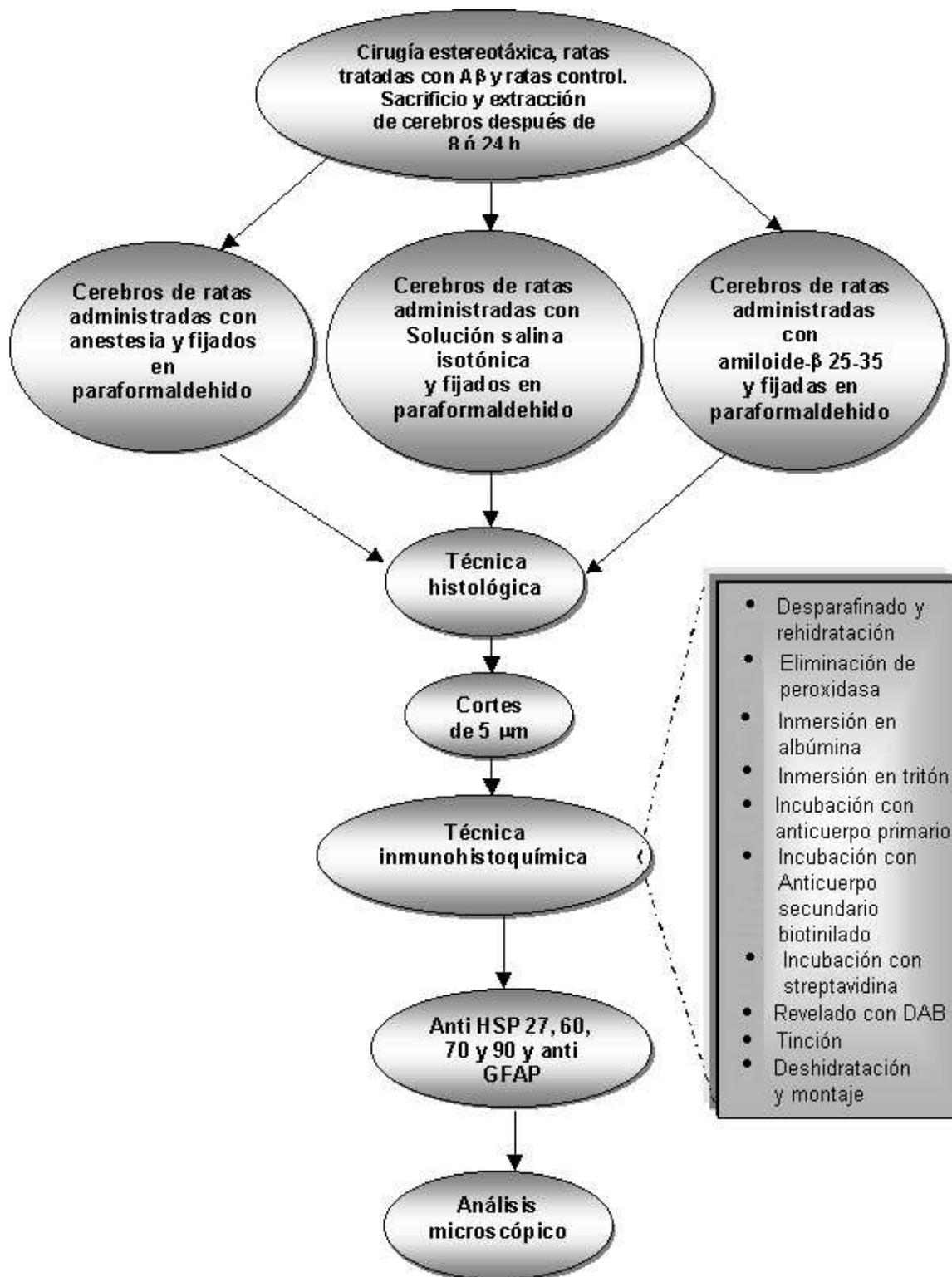
Al administrar la fracción 25-35 de la proteína amiloide- $\beta$  agregada, las células incrementarán la síntesis de HSP para tratar de eliminar o revertir el daño que la proteína amiloide- $\beta$  agregada provoca.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Material biológico:

- En este trabajo fueron utilizadas muestras de cerebros de rata provenientes del Bioterio *Claude Bernard* de la Benemérita Universidad autónoma de Puebla (BUAP). Las muestras se encontraban fijadas en paraformaldehído al 4 % en buffer de fosfatos a una temperatura de 4°C de acuerdo al protocolo del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN).
- La región de los cerebros estudiada correspondió a la región CA2 del hipocampo.
- El procedimiento se llevó a cabo con al menos 3 sujetos de experimentación en cada grupo.
- Los grupos estudiados fueron:
  - ✓ Grupo 1: Ratas macho anestesiadas con hidrato de cloral por vía intraperitoneal y sacrificadas 24 h después.
  - ✓ Grupo 2: Ratas macho anestesiadas con hidrato de cloral por vía intraperitoneal, administradas con 1μL de solución salina isotónica en el hipocampo derecho por medio de cirugía estereotáxica y sacrificadas 8 h después.
  - ✓ Grupo 3: Ratas macho anestesiadas con hidrato de cloral por vía intraperitoneal, administradas con 1μL de solución salina isotónica en el hipocampo derecho por medio de cirugía estereotáxica y sacrificadas 24 h después.
  - ✓ Grupo 4: Ratas macho anestesiadas con hidrato de cloral por vía intraperitoneal, administradas con la proteína amiloide-β 25-35 en el hipocampo derecho por medio de cirugía estereotáxica y sacrificadas 8 h después.
  - ✓ Grupo 5: Ratas macho anestesiadas con hidrato de cloral por vía intraperitoneal, administradas con la proteína amiloide-β 25-35 en el hipocampo derecho por medio de cirugía estereotáxica y sacrificadas 24 h después.
- La proteína amiloide-β se administró: 1μL de la fracción 25-35 de la amiloide-β [100μM], (Sigma Chem. St Louis Mo.) previamente incubada por 24 h a 37°C para asegurar su agregación.

Fig 5. Estrategia experimental:



## 6.2 Método:

### Técnica histológica

Una vez sacrificados los animales de estudio, fueron extraídos los cerebros, etiquetados, cortados y procesados, mediante el siguiente procedimiento histológico:

#### 1. Fijación

Su objetivo es la preservación de los componentes celulares para evitar su degradación y procesos que alteren los componentes celulares, conservando la arquitectura y composición tisular lo más semejante a como se encontraban en el organismo vivo. Las sustancias utilizadas en la fijación tienen la propiedad de penetrar los tejidos y endurecerlos en diferentes grados. En este caso se utilizó el paraformaldehído.

#### 2. Deshidratación

Este proceso tiene la finalidad de eliminar por completo el agua en el espécimen intra y extracelularmente. En este proceso se utilizan alcoholes a concentraciones ascendentes. Se utilizó: etanol a 70, 80, 96 y 100 %, sumergiendo el tejido 3 min en cada uno.

#### 3. Aclaramiento

Este proceso permite que el alcohol de los tejidos sea reemplazado por una sustancia miscible con el medio de inclusión posterior.

Primero se sumergieron los tejidos durante 3 min en una mezcla xilol-etanol 1:1 durante 3 min y después en xilol absoluto por 10 min.

#### 4. Infiltración

Consiste en la ocupación completa de todas las cavidades naturales, espacios e intersticios tisulares y aún los espacios intra y extracelulares con parafina, para lo que los tejidos se sumergieron en parafina fundida por varias h, cuidando que no aumentara mucho la temperatura.

#### 5. Inclusión y elaboración de los bloques

Consiste en la elaboración de un bloque sólido de tejido en el medio de inclusión, se hace a partir de la parafina líquida con un molde donde se coloca el tejido y se hace un enfriamiento lento.

#### 6. Cortes

Este paso se realiza con un micrótopo, que nos permite realizar cortes tisulares de grosor micrométrico y lo suficientemente delgadas para permitir su observación microscópica. En este caso se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$ , los que fueron adheridos a portaobjetos tratados previamente con silano.

Se utilizó un micrótopo de rotación (Reichert histo stat 820, Depew NY)

#### 7. Coloración.

Proceso que se realiza para resaltar las diferencias y distinguir mejor las estructuras tisulares y celulares.

En este caso se realizaron primero las técnicas inmunohistoquímicas (anticuerpos contra HSP 90, HSP 70, HSP 60 HSP 27 y contra GFAP) y la coloración se realizó al final para dar contraste a las preparaciones.

#### **6.3 Anticuerpos utilizados:**

- Anticuerpo contra HSP 27: Anticuerpo policlonal (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, Ca).
- Anticuerpo contra HSP 60: Anticuerpo policlonal (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, Ca).
- Anticuerpo contra HSP 70: Anticuerpo monoclonal (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, Ca).
- Anticuerpo contra HSP 90: Anticuerpo policlonal (Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, Ca).
- Anticuerpo contra la proteína ácida glial fibrilar (GFAP): Glial Fibrillary Acid Protein, anti-rabbit (Dako Co. Carpintería, Ca).

Todos los anticuerpos se utilizaron diluidos con PBS (1:100)

Técnica inmunohistoquímica (ver anexo para más detalles):

Por medio de estas técnicas se detecta la presencia de un péptido o proteína en una célula o tejido, utilizando un anticuerpo monoclonal o policlonal IgG o IgM específico contra él. La técnica está basada en la reacción antígeno-anticuerpo, por ello el anticuerpo primario que se utilice debe haber sido generado en una especie diferente a la que se está estudiando.

Se utilizó un método inmunohistoquímico indirecto, el cual se caracteriza porque la señal del anticuerpo se amplifica utilizando el complejo Avidina-Biotina-peroxidasa.

Aunque se detalla en el apéndice, los pasos generales de la técnica utilizada son:

1. Marcaje de laminillas con lápiz de diamante de acuerdo al tipo de anticuerpo a utilizar
2. Desparafinado y rehidratación de los cortes del tejido

3. Eliminación de peroxidasa endógena
4. Inmersión en solución de albúmina al 2 % en buffer de fosfatos salino (PBS libre de IgG)
5. Inmersión en solución de Tritón 0.2 % en PBS
6. Incubación con el anticuerpo primario
7. Incubación del anticuerpo secundario biotinilado
8. Incubación con Streptavidina HRP (horse radish peroxidasa, reconoce la biotina)
9. Revelado con diaminobencidina (DAB)
10. Tinción de laminillas
11. Deshidratación y montaje de las preparaciones

Después de la técnica inmunohistoquímica se procedió a realizar el análisis de las muestras, observando al microscopio (Leica microsistem, Bensheim Alemania) la región CA2 del hipocampo, se utilizó el programa IM100 de Leica para evaluar los cambios morfológicos y las proteínas buscadas.

## I. RESULTADOS

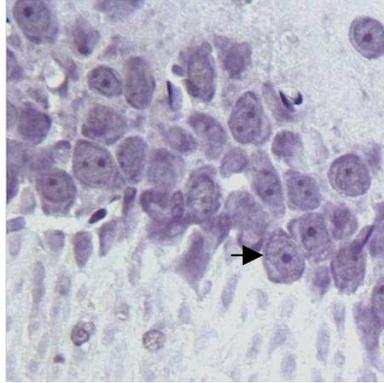
En los cortes obtenidos de los tejidos de las diferentes regiones del hipocampo, se utilizó un método de marcaje inmunohistoquímico indirecto, visualizándose la reacción por medio de un cromógeno contenido en el tetracloruro de la diaminobenzidina (DAB), el cual al oxidarse produce un precipitado insoluble de color café, color que observamos en las muestras en donde hubo reconocimiento positivo de cada uno de los anticuerpos utilizados en este estudio.

### 7.1 Alteraciones morfológicas

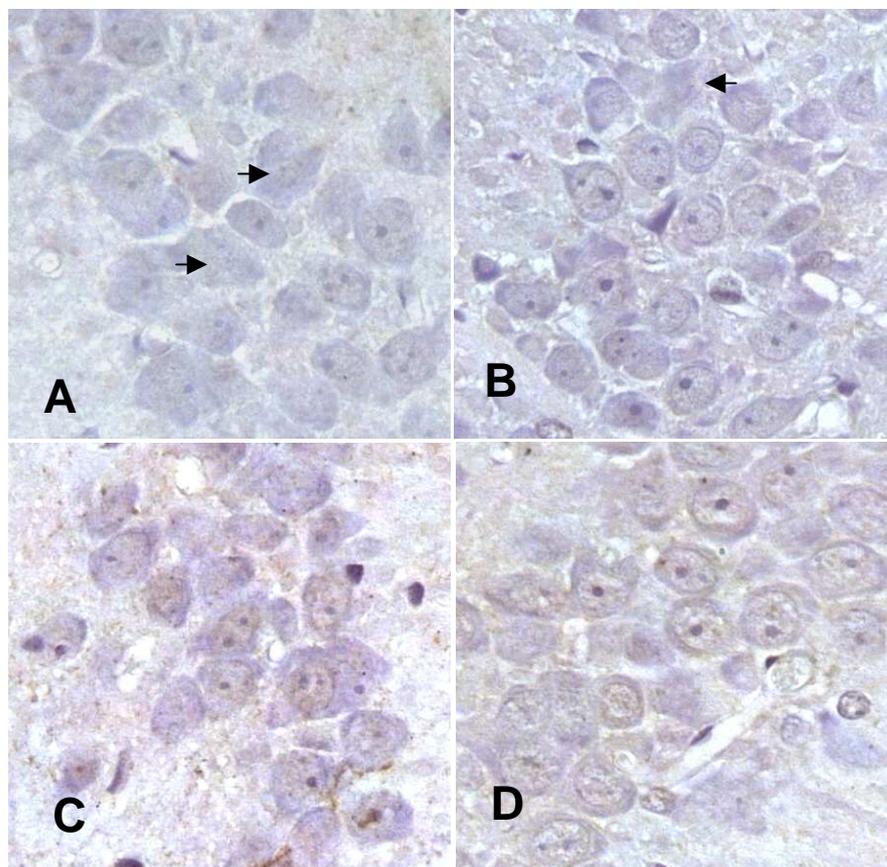
La administración de la fracción 25-35 de la proteína A $\beta$  en general afectó a las neuronas, ya que en la región del hipocampo estudiada (CA2), se pudo observar una leve disminución en su número, además, se observó que las neuronas de los controles tenían una forma más regular, comparadas con las que fueron administradas con solución salina o con el A $\beta$ , en las que se observaron varios casos de neuronas distróficas (ver puntas de flecha en figs. 6 y 7, A y B).

### 7.2 Resultados para ratas que sólo fueron administradas con anestesia

El anestésico fue administrado por vía intraperitoneal y los sujetos de estudio se sacrificaron después de 24 h. No se presentaron alteraciones morfológicas ni reactividad positiva contra los anticuerpos que reconocen a las HSP estudiadas (fig. 6). Las células mostraron forma regular, integridad y ordenamiento, con coloración morada uniforme en el citoplasma y pudiendo observarse resaltados los núcleos de varias neuronas también en morado.



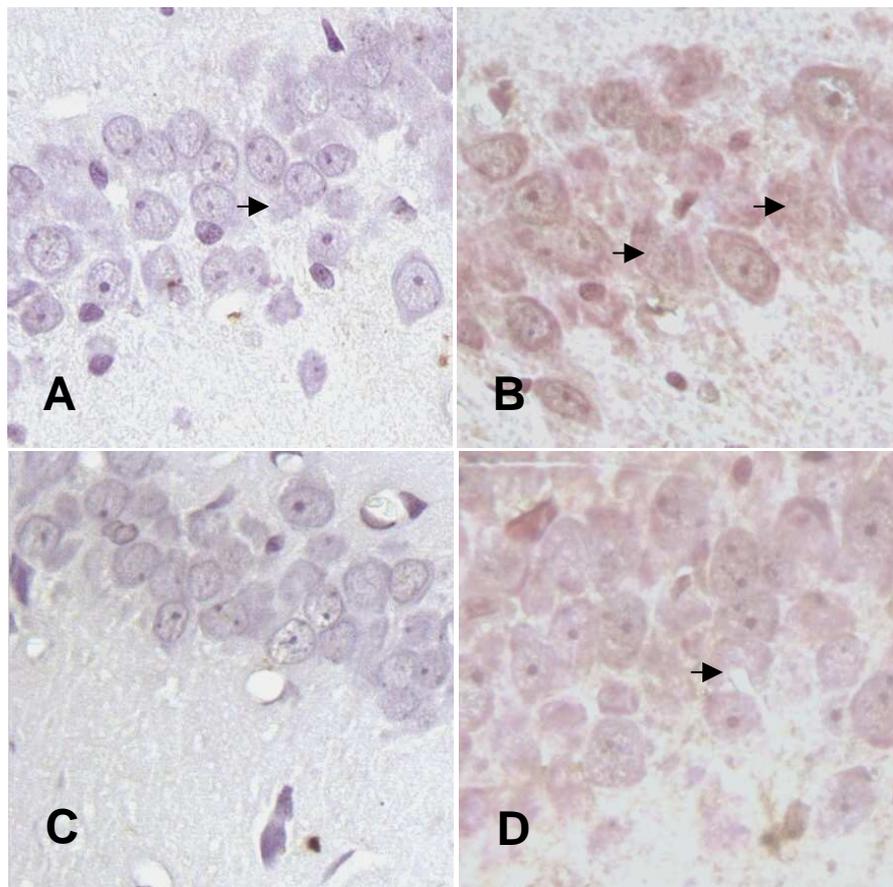
**Figura 6. Inmunohistoquímica de cortes de la región del hipocampo de ratas control tratadas sólo con anestesia.** Las ratas fueron anestesiadas según el procedimiento descrito en “materiales y métodos”. La técnica se hizo con los anticuerpos anti-HSP 27, 60, 70 y 90. Se presenta un corte representativo de 3 cortes obtenidos de 3 ratas para cada anticuerpo. Magnificación 40X.



**Figura 7. Presencia de HSP 27 en hipocampo derecho (ipso) e izquierdo (contralateral) después de 8 h.** La proteína HSP 27 fue detectada por inmunohistoquímica según se describe en “materiales y métodos”. **A**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con SSI. **B**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con Aβ. **C**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con SSI. **D**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con Aβ. Las flechas señalan algunas neuronas distróficas. Aβ = Amiloide-β fracción 25-35, SSI = solución salina isotónica. Los cortes que se presentan son una muestra representativa de 3 cortes obtenidos de 3 ratas. Magnificación 40X.

### 7.3 Resultados para anti HSP 27

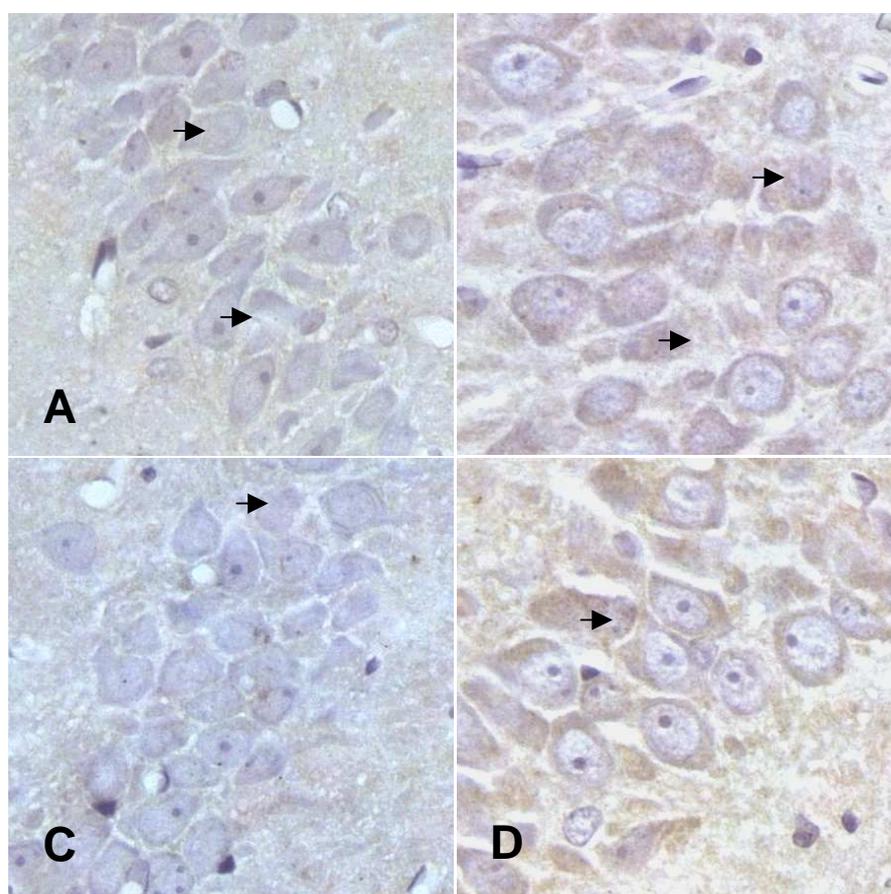
Para las ratas que fueron sacrificadas después de 8 h (fig. 7) se observó que las tratadas con SSI no presentaron reconocimiento del anticuerpo en hipocampo derecho ni izquierdo (fig. 7, A y C), las células se ven de color morado uniforme aunque se observaron varias células distróficas (ver puntas de flecha), mientras que las administradas con A $\beta$  (fig. 7, B y D) mostraron un reconocimiento negativo del anticuerpo en el hipocampo derecho, en el cual las células se ven de color azul uniforme, y muy leve en el izquierdo, donde se puede ver una ligera coloración café.



**Figura 8. Presencia de HSP 27 en hipocampo derecho (ipso) e izquierdo (contralateral) después de 24 h.** La proteína HSP 27 fue detectada por inmunohistoquímica según se describe en “materiales y métodos”. **A**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con SSI. **B**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con A $\beta$ . **C**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con SSI. **D**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con A $\beta$ . A $\beta$  = Amiloide- $\beta$  fracción 25-35, SSI = solución salina isotónica. Los cortes que se presentan son una muestra representativa de 3 cortes obtenidos de 3 ratas. Magnificación 40X.

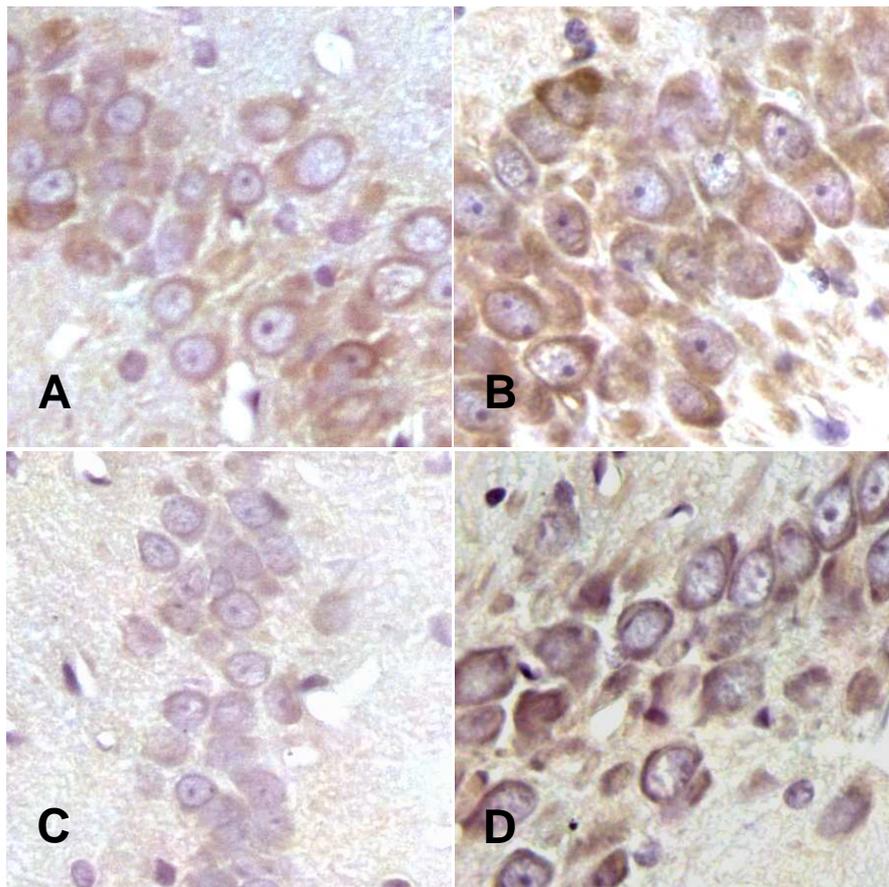
Los cerebros de las ratas sacrificadas después de 24 h (fig. 8), mostraron que las tratadas con SSI no presentaron reactividad contra el anticuerpo (fig. 8, A y C). La morfología presentada por las células mostró un contorno regular, tinción de color azul, resaltándose los núcleos y casi sin observarse células distróficas. Las células de cortes de hipocampo administradas con A $\beta$ , mostraron un reconocimiento intenso en ambos hipocampos (fig. 8, B y D), presentando una coloración café y observándose varios casos de células distróficas (ver puntas de flecha).

#### 7.4 Resultados para anti HSP 60



**Figura 9. Presencia de HSP 60 en hipocampo derecho (ipso) e izquierdo (contralateral) después de 8 h.** La proteína HSP 60 fue detectada por inmunohistoquímica según se describe en “materiales y métodos”. **A**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con SSI. **B**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con A $\beta$ . **C**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con SSI. **D**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con A $\beta$ . A $\beta$  = Amiloide- $\beta$  fracción 25-35, SSI = solución salina isotónica. Los cortes que se presentan son una muestra representativa de 3 cortes obtenidos de 3 ratas. Magnificación 40X.

Para las ratas que fueron sacrificadas después de 8 h (fig. 9) se observa que las tratadas con SSI no presentan reactividad positiva para el anticuerpo (fig. 9, A y C), las células se observan en color azul aunque no son de forma regular y hay varias células distróficas (ver flechas). Los cerebros administrados con A $\beta$  mostraron una reactividad moderada contra el anticuerpo (fig. 9, B y D), las células presentan una coloración café y también se observan células distróficas. Esto se observó tanto para el hipocampo derecho, como para el izquierdo.

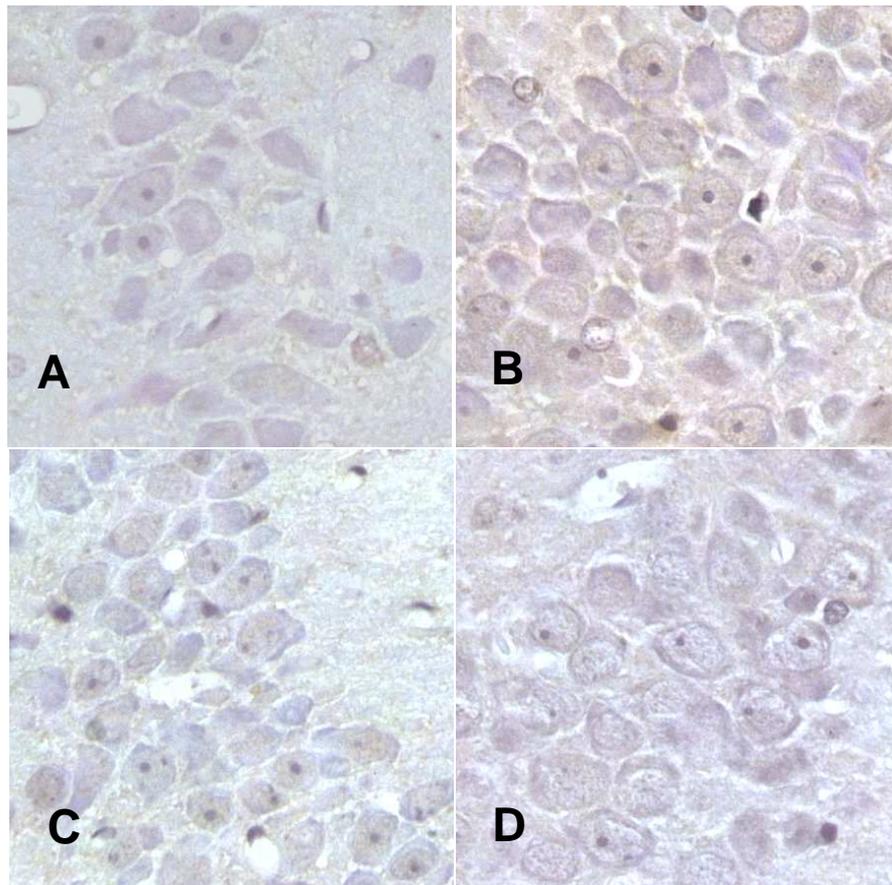


**Figura 10. Presencia de HSP 60 en hipocampo derecho (ipso) e izquierdo (contralateral) después de 24 h.** La proteína HSP 60 fue detectada por inmunohistoquímica según se describe en “materiales y métodos”. **A**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con SSI. **B**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con A $\beta$ . **C**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con SSI. **D**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con A $\beta$ . A $\beta$  = Amiloide- $\beta$  fracción 25-35, SSI = solución salina isotónica. Los cortes que se presentan son una muestra representativa de 3 cortes obtenidos de 3 ratas. Magnificación 40X.

Los cerebros de las ratas sacrificadas después de 24 h (fig. 10), mostraron que las tratadas con SSI presentan un reconocimiento moderado del anticuerpo para hipocampo derecho y leve para el izquierdo (fig. 10, A y C), las células presentan formas regulares aunque también hay algunas distróficas y presentan coloración café moderada y leve respectivamente. Los

cerebros de ratas a las que se les administró el  $A\beta$ , muestran un reconocimiento intenso del anticuerpo en ambos hipocampos (fig. 11, B y D), las células presentan coloración café intenso, la mayoría tienen forma regular aunque hay varias neuronas distróficas tanto en el hipocampo derecho como en el izquierdo.

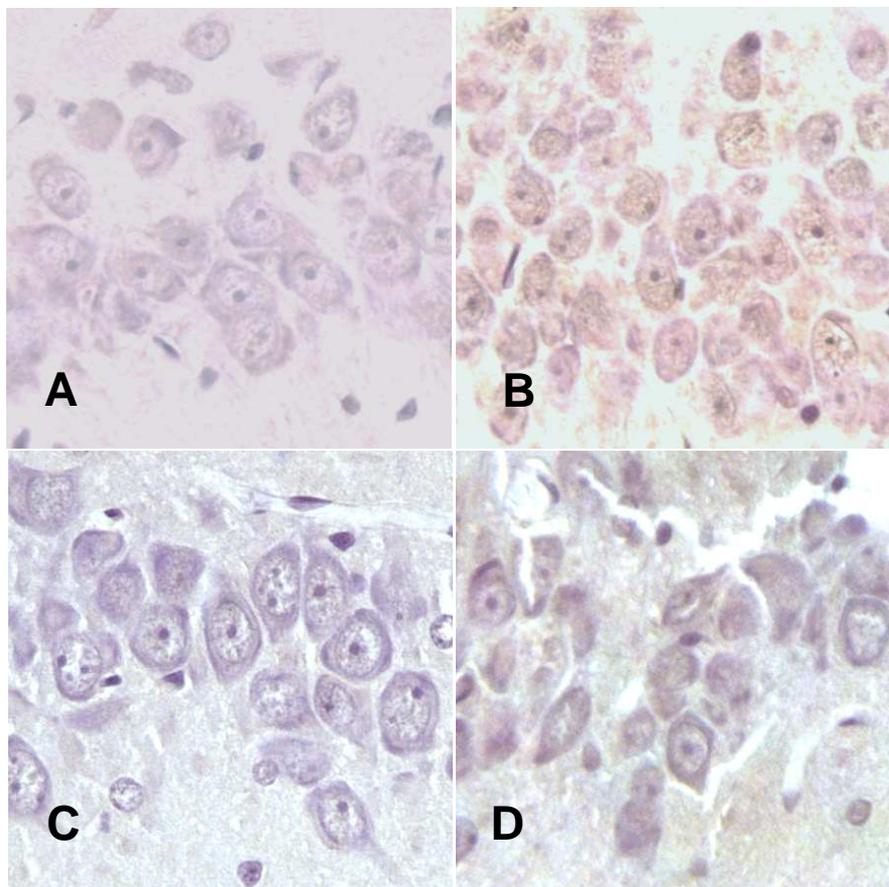
### 7.5 Resultados para anti HSP 70



**Figura 11. Presencia de HSP 70 en hipocampo derecho (ipso) e izquierdo (contralateral) después de 8 h.** La proteína HSP 70 fue detectada por inmunohistoquímica según se describe en “materiales y métodos”. **A**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con SSI. **B**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con  $A\beta$ . **C**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con SSI. **D**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con  $A\beta$ .  $A\beta$  = Amiloide- $\beta$  fracción 25-35, SSI = solución salina isotónica. Los cortes que se presentan son una muestra representativa de 3 cortes obtenidos de 3 ratas. Magnificación 40X.

Para las ratas que fueron sacrificadas después de 8 h (fig. 11) se observó que las tratadas con SSI no presentaron reconocimiento del anticuerpo (fig. 11A y C), mostrando una coloración azul uniforme, sin embargo son de forma muy irregular y hay muchos casos de células distróficas, mientras que las administradas con  $A\beta$  mostraron un reconocimiento muy

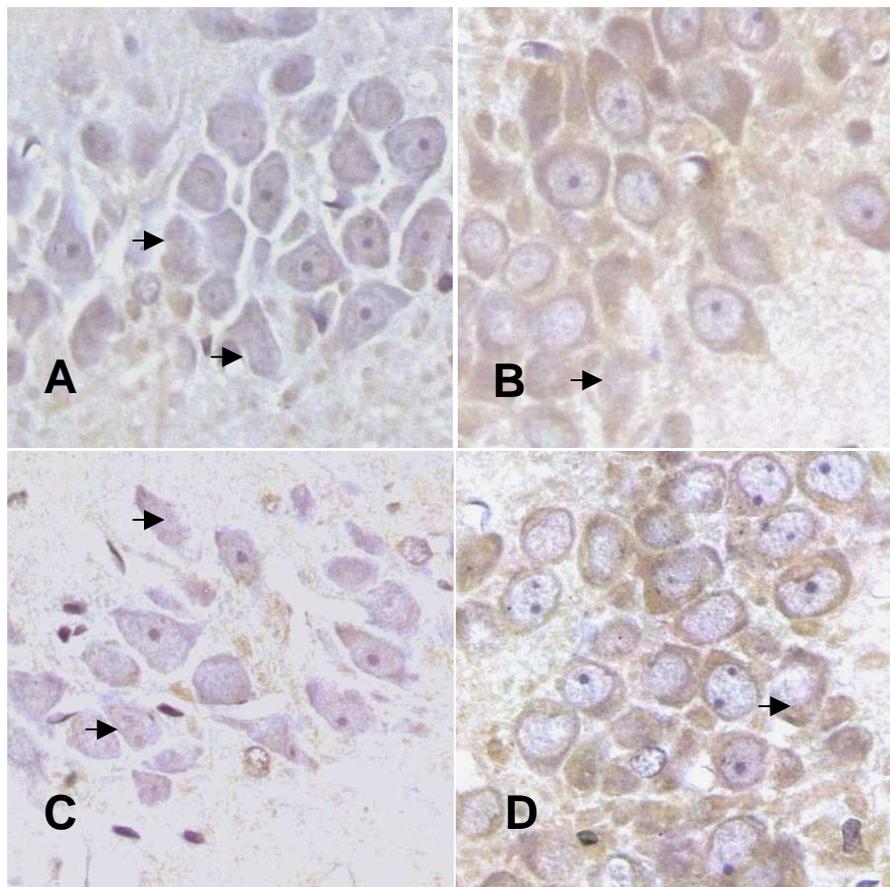
bajo del anticuerpo (fig. 11, B y D), formas más regulares con una ligera coloración café y algunas neuronas distróficas. Esto se observó tanto para el hipocampo derecho, como para el izquierdo.



**Figura 12. Presencia de HSP 70 en hipocampo derecho (ipso) e izquierdo (contralateral) después de 24 h.** La proteína HSP 70 fue detectada por inmunohistoquímica según se describe en “materiales y métodos”. **A**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con SSI. **B**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con A $\beta$ . **C**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con SSI. **D**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con A $\beta$ . A $\beta$  = Amiloide- $\beta$  fracción 25-35, SSI = solución salina isotónica. Los cortes que se presentan son una muestra representativa de 3 cortes obtenidos de 3 ratas. Magnificación 40X.

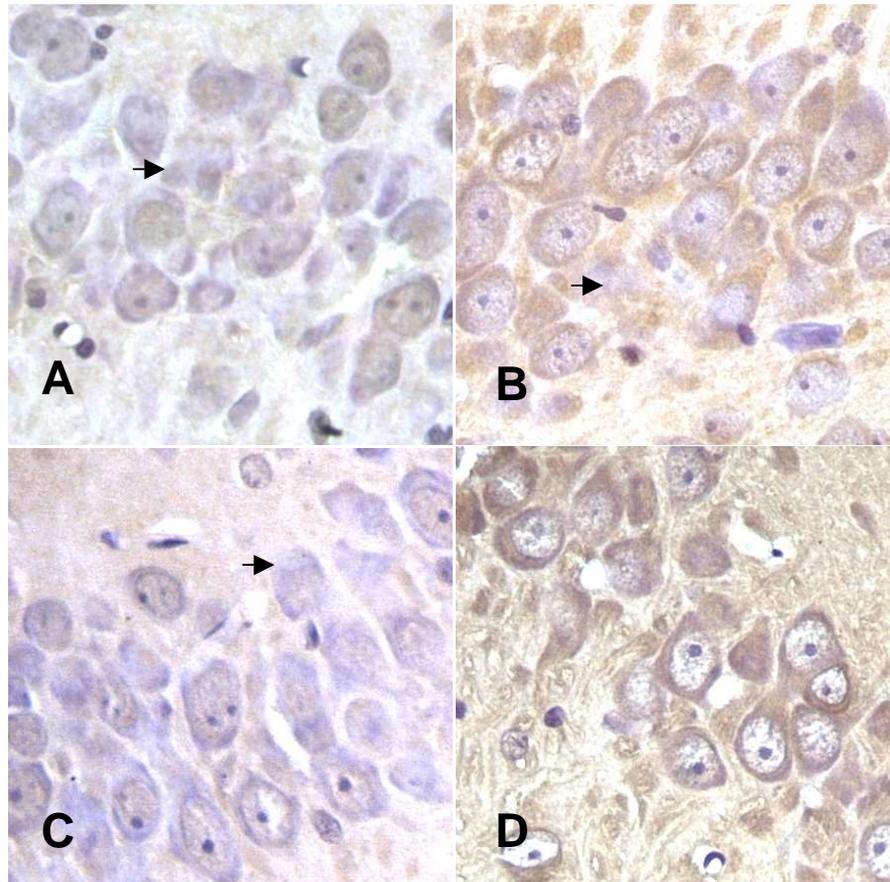
Los cerebros de las ratas sacrificadas después de 24 h (fig. 12), mostraron que las tratadas con SSI no presentan reconocimiento del anticuerpo para ninguno de los dos hipocampos (fig. 12, A y C), las células presentaron coloración azul, resaltándose los núcleos celulares y observándose células de forma irregular, en especial en el hipocampo derecho, en donde también se pueden apreciar varias neuronas distróficas. Los cerebros de ratas administradas con A $\beta$ , mostraron un reconocimiento moderado del anticuerpo, también en ambos hipocampos (fig. 12, B y D), presentando una coloración de color café claro, y con varios casos de neuronas de forma irregular y neuronas distróficas.

## 7.6 Resultados para anti HSP 90



**Figura 13. Presencia de HSP 90 en hipocampo derecho (ipso) e izquierdo (contralateral) después de 8 h.** La proteína HSP 27 fue detectada por inmunohistoquímica según se describe en “materiales y métodos”. **A**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con SSI. **B**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con A $\beta$ . **C**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con SSI. **D**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con A $\beta$ . A $\beta$  = Amiloide- $\beta$  fracción 25-35, SSI = solución salina isotónica. Los cortes que se presentan son una muestra representativa de 3 cortes obtenidos de 3 ratas. Magnificación 40X.

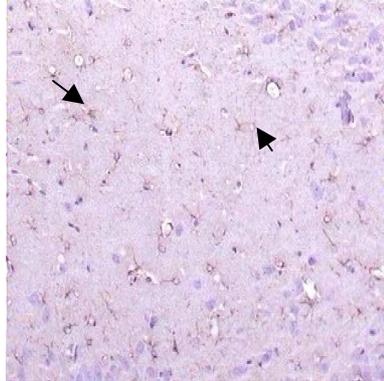
Para las ratas que fueron sacrificadas después de 8 h (fig 13) se observó que las tratadas con SSI no presentaron evidencia de reactividad positiva del anticuerpo para hipocampo derecho ni para hipocampo izquierdo (fig. 13, A y C), las células se observaron en color azul, resaltándose los núcleos; sin embargo, hubo una importante disminución en el número de células, éstas presentaron formas irregulares y algunas mostraron distrofia. Las células de ratas administradas con A $\beta$  mostraron un reconocimiento muy intenso del anticuerpo (fig. 13, B y D) para ambos hipocampos, observándose una coloración café intensa en citoplasma. Las células mostraron formas regulares, sin embargo se presentaron muchos casos de neuronas distróficas (ver flechas).



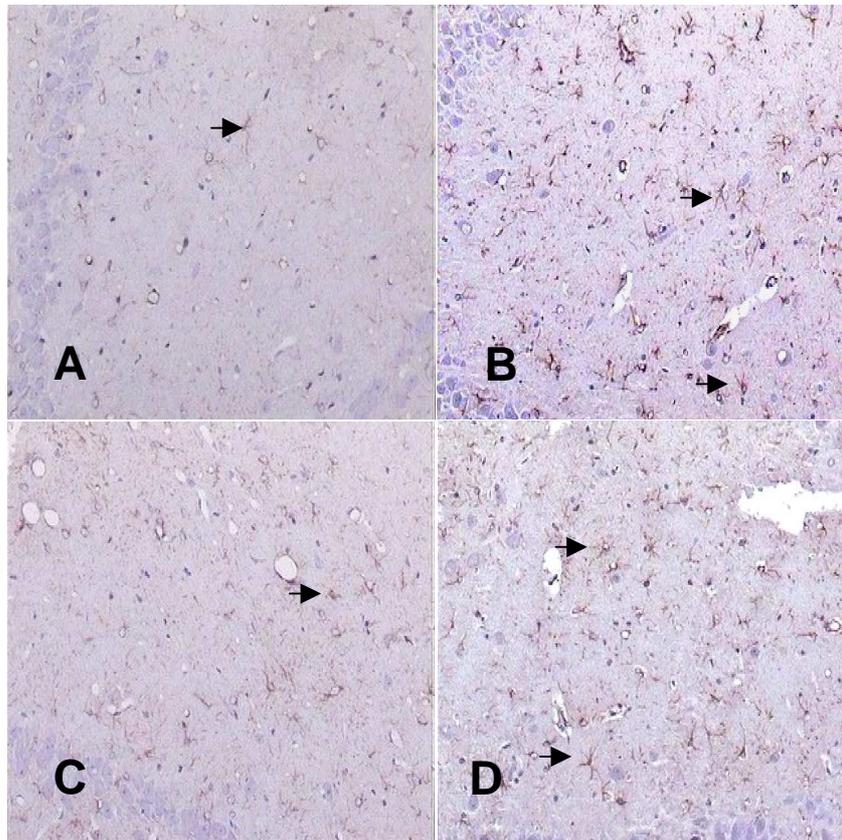
**Figura 14. Presencia de HSP 90 en hipocampo derecho (ipso) e izquierdo (contralateral) después de 24 h.** La proteína HSP 27 fue detectada por inmunohistoquímica según se describe en “materiales y métodos”. **A**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con SSI. **B**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con A $\beta$ . **C**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con SSI. **D**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con A $\beta$ . A $\beta$  = Amiloide- $\beta$  fracción 25-35, SSI = solución salina isotónica. Los cortes que se presentan son una muestra representativa de 3 cortes obtenidos de 3 ratas. Magnificación 40X.

Los cerebros de las ratas sacrificadas después de 24 h (fig 14), mostraron que las tratadas con SSI presentaron un reconocimiento leve y negativo del anticuerpo para hipocampo derecho e izquierdo respectivamente (fig. 14, A y C); las células del hipocampo derecho muestran una coloración café leve, mientras que las del hipocampo izquierdo presentaron coloración azul; en ambos casos se observaron neuronas de formas irregulares y distróficas. Los cerebros administrados con A $\beta$ , mostraron un reconocimiento intenso del anticuerpo para ambos hipocampos (fig. 14, B y D), las células presentaron una coloración café intenso y formas más regulares, aunque también se observaron algunas neuronas distróficas (ver flechas).

### 7.7 Resultados para anti GFAP.



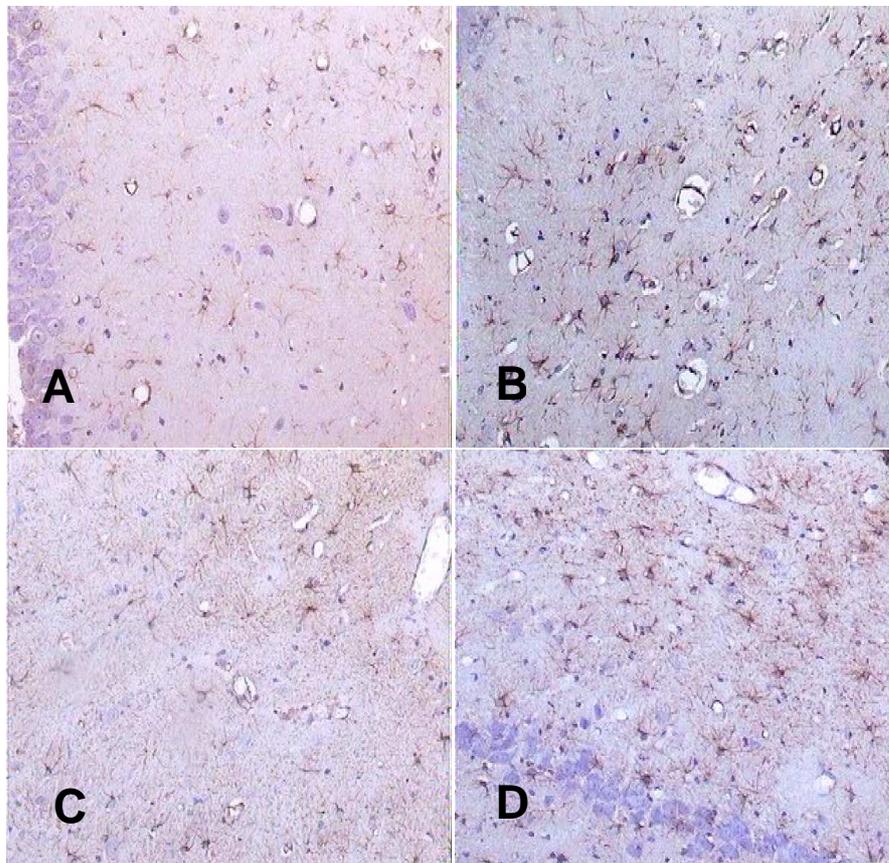
**Figura 15. Inmunohistoquímica de cortes de la región del hipocampo de ratas control tratadas sólo con anestesia.** Las ratas fueron anestesiadas según el procedimiento descrito en “materiales y métodos”. La técnica se hizo con el anticuerpo anti-GFAP. Se presenta un corte representativo de 3 cortes obtenidos de 3 ratas para cada anticuerpo. Magnificación 20X.



**Figura 16. Presencia de GFAP en hipocampo derecho (ipso) e izquierdo (contralateral) después de 8 h.** GFAP detectado por inmunohistoquímica según se describe en “materiales y métodos”. **A**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con SSI. **B**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con A $\beta$ . **C**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con SSI. **D**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con A $\beta$ . A $\beta$  = Amiloide- $\beta$  fracción 25-35, SSI = solución salina isotónica. Los cortes que se presentan son una muestra representativa de 3 cortes obtenidos de 3 ratas. Magnificación 20X.

En los cerebros de las ratas a las que se les administró sólo el anestésico se observó un leve reconocimiento del anticuerpo (fig. 15). Se observaron algunos casos de astrocitos reactivos que expresaron GFAP (ver flechas), que se pudo distinguir en estructuras en forma de “estrella” de color café.

Para las ratas que fueron sacrificadas después de 8 h (fig. 16) se observó que las tratadas con SSI presentaron un reconocimiento leve del anticuerpo (fig. 16, A y C), comparable con los controles. Los casos de astrocitos reactivos que expresaron GFAP fueron mínimos, mientras que los cerebros de las ratas administradas con A $\beta$  mostraron un reconocimiento moderado del anticuerpo (fig. 16, B y D), (ver flechas). Los astrocitos que expresaron GFAP fueron ligeramente más abundantes, lo cual se observó de forma similar tanto para el hipocampo derecho, como para el izquierdo.



**Figura 17. Presencia de GFAP en hipocampo derecho (ipso) e izquierdo (contralateral) después de 24 h.** GFAP fue detectado por inmunohistoquímica según se describe en “materiales y métodos”. **A**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con SSI. **B**, corte de hipocampo derecho de rata administrada con A $\beta$ . **C**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con SSI. **D**, corte de hipocampo izquierdo de rata administrada con A $\beta$ . A $\beta$  = Amiloide- $\beta$  fracción 25-35, SSI = solución salina isotónica. Los cortes que se presentan son una muestra representativa de 3 cortes obtenidos de 3 ratas. Magnificación 20X.

Los cerebros de las ratas sacrificadas después de 24 h (fig. 17), mostraron que las tratadas con SSI tuvieron un reconocimiento leve y moderado del anticuerpo para hipocampo derecho e izquierdo respectivamente (fig. 17, A y C), mientras que las administradas con A $\beta$ , mostraron un reconocimiento intenso del anticuerpo en ambos casos (fig. 17, B y D), siendo muy abundantes los astrocitos que expresaron GFAP en esta condición.

**Tabla 2. Efecto de la administración de la fracción 25-35 del péptido A $\beta$  en los niveles de HSP y GFAP en las regiones ipso (derecha) y contralateral (izquierda) del hipocampo.**

Los niveles de proteínas se estimaron a partir de la reactividad de los cortes de tejido a los anticuerpos específicos. (-) ausencia de reconocimiento, (+) reconocimiento positivo mínimo, (++) reconocimiento positivo medio, (+++) reconocimiento positivo intenso.

Anticuerpo	HSP 27		HSP 60		HSP 70		HSP 90		GFAP	
	der	izq	der	izq	der	izq	der	izq	der	izq
Anestesia	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SSI 8 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SSI 24 horas	-	-	++	+	-	-	+	-	+	++
$\beta$ 8 horas	-	+	++	++	+	+	+++	+++	++	++
$\beta$ 24 horas	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++

## II. DISCUSIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas son uno de los temas más estudiados en la actualidad debido al aumento de su incidencia.

En las últimas décadas se han descrito diversos procesos bioquímicos que ocurren durante la enfermedad de Alzheimer, lo que ha permitido vislumbrar la complejidad de las reacciones del organismo ante la enfermedad, así como las moléculas implicadas y los procesos en que éstas participan, sin embargo aún hay mucho por saber, entre otras cosas hay que identificar y caracterizar las moléculas que generan o tienen alguna participación en la disfunción y muerte neuronal, así como las condiciones fisiológicas celulares que las regulan.

Aunque los estudios se han llevado a cabo principalmente en proteínas, se han estudiado otro tipo de moléculas, encontrándose alteraciones en las propiedades y estructuras de estas, por ejemplo, se ha determinado la presencia anormal de ciertos oligosacáridos (Espinosa *et al.*, 2001).

En cuanto a proteínas, el mayor interés se centra en el metabolismo, ya que los errores se han relacionado al daño y a la muerte celular, lo que en el sistema nervioso central conduce a la pérdida de las funciones cognitivas. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, se han identificado alteraciones en la proteína A $\beta$  (Muñoz 2001; Joseph *et al.*, 2001).

Aunque se han estudiado diferentes fracciones de la A $\beta$ , diversos estudios postulan que la fracción 25-35 es la parte neurotóxica más importante (Chen *et al.*, 1996; Stepanichev *et al.*, 2004). Se han propuesto varios mecanismos de toxicidad: aumento de los niveles de estrés oxidativo (Monji *et al.*, 2002), reducción de la actividad de la acetilcolinesterasa pero no de la acetilcolina (Butterfield and Bush 2004; Butterfield and Boyd-Kimball 2005), inhibición de la recaptura del glutamato, muerte celular de cultivo primario de neuronas (Lee *et al.*, 2006), producción de pérdida de la memoria y disminución del aprendizaje (Stepanichev *et al.*, 2003; Stepanichev *et al.*, 2004). Además, estudios histopatológicos (Kowall *et al.*, 1991) indican que esta fracción causa neurodegeneración en estructuras como el hipocampo y la corteza cerebral.

En modelos animales se ha visto que tras la administración de la A $\beta$ , ésta tiende a acumularse en el cerebro, en donde daña a las neuronas, activa microglías (células del

sistema inmune, protectoras del sistema nervioso con capacidad de fagocitar), causa daño oxidativo en células vecinas (Delobette *et al.*, 1997), estimula apoptosis, dificulta la perfusión por la acumulación de amiloide en capilares y arteriolas y afecta los contactos sinápticos interneuronales (Frautschy 1991).

Por otra parte, recientemente se han estado estudiando las HSP como respuesta de las células ante las agresiones, y aunque sabemos que el depósito de la fracción 25-35 de la A $\beta$  en ratas ya ha sido evidenciado, (Stepanichev *et al.*, 2003; Stepanichev *et al.*, 2004) aún faltan por conocer los efectos que éste tiene en la síntesis de HSP.

Al realizar la administración de la fracción 25-35 de la A $\beta$  en el hipocampo derecho de ratas (lugar en donde se manifiesta primero el daño en la EA), se obtiene un modelo que nos da una aproximación a lo que ocurre durante la enfermedad de Alzheimer (Stepanichev *et al.*, 2003; Stepanichev *et al.*, 2004). En este modelo, se pueden observar tanto cambios morfológicos como algunos mecanismos de defensa que parecen ser relevantes contra el daño oxidativo y el daño conformacional de proteínas, como son las HSP, además del efecto en el sistema inmune (por medio de la identificación de GFAP), contribuyendo a entender un poco más el proceso de neurodegeneración asociado a la EA.

Previamente se han realizado estudios (Cuevas 2003) que permiten tener un panorama de la morfología del cerebro tras la administración de la A $\beta$  25-35, y en los cuales se ha encontrado que la A $\beta$  tiene el efecto neurotóxico a una concentración 100  $\mu$ M, disuelta en SSI o agua destilada, polimerizada de 24 a 48 h a un pH de 7.4, además el estudio se realizó en grupos de 3 individuos para asegurar que los resultados se debieron al tratamiento y no a variaciones en los individuos.

Las técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas se utilizan actualmente para la confirmación post-mortem del diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, ya que permiten visualizar las lesiones típicas (Skodras *et al.*, 1993). En este trabajo, estas técnicas nos ayudan a visualizar algunos de los eventos morfológicos que se llevan a cabo debido a la presencia de la proteína A $\beta$  agregada.

Al realizarse la identificación de las HSP 8 y 24 h después de la administración de la A $\beta$ , se obtiene una aproximación del tiempo de respuesta del organismo, ya que como mecanismo

de defensa, las HSP tienen cierto límite, y si el daño persiste, o es muy grande comienza a disminuir su actividad (Magrané *et al.*, 2004).

Se encontraron cambios morfológicos y una reducción en el número de neuronas, se incrementó la síntesis de HSP, observándose además un aumento de los astrocitos que expresan GFAP.

Se propone que las células incrementan la síntesis de HSP como un intento de defensa en respuesta al péptido depositado. Las HSP comenzaron a sintetizarse en diferentes proporciones, observándose esto claramente después de 24 h, aunque las diferentes familias se sintetizan, en diferentes cantidades dependiendo del tejido y la magnitud del daño. Esto sugiere que la cascada de eventos moleculares que conducen a su síntesis también difiere. Estas proteínas podrían ser útiles para restaurar y proteger proteínas dañadas durante la inyección del A $\beta$ , y para inhibir y disolver al menos parcialmente sus depósitos, lo cual también resultaría en la reversión de las alteraciones cerebrales como daño neuronal y activación de microglías.

Además se encontró respuesta de producción de las HSP y de GFAP tanto en el hipocampo derecho como en el izquierdo, con lo que se puede ver que la proteína A $\beta$  25-35 produce un daño que se propaga inclusive al hemisferio opuesto al daño (Ayala and Tapia 2003).

Se encontraron resultados importantes que nos hablan de la importancia de las HSP, y dan pie a futuras investigaciones donde se determine la presencia de las HSP identificadas y de otras familias no incluidas en este estudio en casos de personas que tuvieron la enfermedad.

### **Efecto del procedimiento quirúrgico**

Este grupo es muy importante, ya que muestra lo que ocurre en el cerebro cuando no se efectúa la cirugía estereotáxica, que por sí misma es una agresión y un factor que podría provocar una respuesta fisiológica que incluiría activación del sistema inmune y producción de HSP, por lo tanto podemos tomarlo como grupo control.

Ya que tanto las HSP como GFAP se encuentran de manera normal en pequeñas cantidades en todos los individuos y este grupo nos permite asegurar que los niveles de proteínas detectados en los cerebros de animales administrados por medio de la cirugía, no son los que normalmente se expresan.

Como se pudo observar, para este grupo en ningún caso se pudo detectar reactividad positiva contra los anticuerpos de ninguna de las HSP, lo que nos dice que los niveles basales existentes en condiciones normales son mínimos y no detectables con esta técnica.

Por otra parte, en estos cerebros es posible ver las características de las células nerviosas en condiciones normales, las que se ven de color morado, resaltando los núcleos debido a la tinción con hematoxilina, de tal forma que se pueden comparar con las células de los cerebros tratados con cirugía.

### **Efecto en HSP 27**

A las ratas a las que les fue administrada la SSI no fue posible detectar la presencia de HSP 27 en ninguno de los dos hipocampos, de lo que se puede deducir que la cirugía estereotáxica y la administración de SSI no produce el daño necesario para incrementar la síntesis de esta HSP.

Para los animales a los que se les administró A $\beta$ , el incremento significativo se observó después de 24 h. La reacción fue muy clara y similar en ambos hipocampos, lo que nos habla de la comunicación entre los hemisferios cerebrales. Por lo tanto, la A $\beta$  sí induce la síntesis de HSP 27 y esta respuesta es muy significativa 24 h después de la administración, lo que está relacionada con sus funciones, que son tanto de chaperona como de protección a proteínas dañadas en condiciones de estrés, cuando es inducible, lo cual podría explicar los resultados obtenidos (Craig *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2006; Wilhelmus *et al.*, 2006).

### **Efectos en HSP 60**

Los cerebros de ratas a las que se les administró SSI sólo presentaron reconocimiento moderado del anticuerpo para esta HSP después 24 h, mientras que a las ratas que se les administró con el A $\beta$ , después de 8 h ya hay una reactividad positiva y por lo tanto un incremento moderado en la síntesis de esta HSP; después de 24 h de la administración, el reconocimiento del anticuerpo fue muy notorio en ambas regiones del hipocampo, lo anterior podría estar relacionado con la función de HSP 60 como ayudante en la reparación de proteínas dañadas, ya que en su forma inducible tienen importantes funciones en el plegamiento de proteínas recién sintetizadas y dañadas.

Se puede notar que HSP 60 es una proteína de gran importancia que se comienza a sintetizar rápidamente y la síntesis se mantiene al menos 24 h como un probable intento de defensa ante el daño producido por la A $\beta$  (Craig *et al.*, 1994; Bukau and Horowich 1998).

### **Efectos en HSP 70**

Los cerebros de las ratas a las que se les administró SSI no mostraron ninguna reactividad para el anticuerpo anti HSP 70, mientras que los tratados con A $\beta$  dieron como resultado un reconocimiento mínimo e igual para ambas regiones del hipocampo después de 8 h y moderado e igual para ambas regiones del hipocampo después de 24 h, lo cual indica que la A $\beta$  es capaz de incrementar la síntesis de HSP 70, sin embargo la respuesta es menos significativa que en el caso de las otras HSP estudiadas, lo que podría explicarse al considerar que el papel de HSP 70 es principalmente en el transporte a través de organelos celulares (Craig *et al.*, 1994; Bukau and Horowich 1998), además de que necesita asociarse con proteínas coaperonas de las que depende su función, Por otra parte, la síntesis de puede no ser activa y observable en el lapso de 24 h (Magrané *et al.*, 2004).

### **Efectos en HSP 90**

HSP 90 es una familia de proteínas que juega un importante papel tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés para las células (Caplan 1999), aunque no se obtuvo una respuesta positiva sólo con anestesia, era de esperarse una alta reactividad del anticuerpo tras la administración de la A $\beta$ .

Para las ratas a las que se les administró SSI no se obtuvo reconocimiento positivo después de 8 h, sin embargo después de 24 h se observó un reconocimiento aunque mínimo en el hipocampo derecho (donde se produjo el daño). Así que la SSI fue capaz de provocar aunque en mínima proporción, un aumento en la síntesis de esta HSP después de 24 h.

Los cerebros tratados con A $\beta$  provocan una reactividad muy clara y significativa del anticuerpo tanto después de 8 como de 24 h en ambas regiones del hipocampo, así que la A $\beta$  sí indujo la síntesis de HSP 90. Esta respuesta es muy importante y rápida, lo que nos habla de la importancia de esta HSP que como una más de sus múltiples funciones ayuda en la protección de las proteínas recién sintetizadas y las que sufrieron modificaciones ante el daño producido.

## **Efectos en GFAP**

GFAP (proteína ácida glial fibrilar) es una proteína producida por factores de inflamación y en condiciones normales se encuentra en cantidades muy bajas. Se le considera como un marcador de activación de la microglía por pérdida neuronal.

La inmunohistoquímica detectó numerosos astrocitos reactivos, debido probablemente al daño generado por la proteína A $\beta$ , lo que provocó que la microglía se hiciera fagocítica agrediendo a las neuronas vecinas directamente, o las agrede indirectamente, liberando citocinas inflamatorias, óxido nítrico y otras neurotoxinas que pudieron dañar neuronas cercanas.

Ya que los cerebros de las ratas tratadas solo con el anestésico presentaron un reconocimiento positivo leve al anticuerpo anti-GFAP, este nivel de reactividad se toma como punto de comparación para notar si la SSI o la A $\beta$  producen un incremento en la activación de la microglía.

No se observó un incremento de consideración en la reactividad del anticuerpo para las ratas tratadas con SSI con respecto a las ratas que no fueron sometidas a la cirugía, esto indica que la SSI no produce activación de la microglía de manera importante. En contraste con lo anterior, los cerebros tratados con A $\beta$  mostraron una reactividad positiva desde las 8 h después de la administración y una reactividad fuerte a las 24 h en ambos hipocampos.

Aunque se han obtenido resultados importantes, el estudio bioquímico molecular de las alteraciones patológicas que ocurren en la EA, así como la respuesta de los organismos, sigue siendo clave para comprender la enfermedad.

## CONCLUSIONES

- ✓ Se producen alteraciones morfológicas en las neuronas del hipocampo como consecuencia de la presencia de la fracción 25-35 de la A $\beta$ .
- ✓ La administración de la fracción 25-35 de la A $\beta$  al hipocampo de ratas macho produce después de 8 h un aumento mínimo en los niveles de HSP 27 y HSP 70, moderado en los niveles de HSP 60 e intenso en el caso de HSP 90.
- ✓ La administración de la fracción 25-35 de la A $\beta$  al hipocampo de ratas macho produce un marcado aumento en la producción de todas las HSP estudiadas después de 24 h.
- ✓ La administración de la fracción 25-35 de la A $\beta$  al hipocampo de ratas macho produce activación moderada de la microglía después de 8 h y muy intensa a las 24 h.

## APÉNDICE

### ✓ Cirugía estereotáxica y manejo de animales:

Equipo:

Aparato estereotáxico (Stoelting, Co.)

Jeringa de inyección de 10  $\mu$ l (Hamilton, Mod. 00685)

Bisturí con navaja No. 22 (Bard-Parker).

Pinzas de disección.

Reactivos:

Hidrato de cloral (Sigma Chem. St Louis Mo).

Solución salina isotónica.

Amiloide- $\beta$  (NH<sub>2</sub>-GSNKGAIIGLM-COOH), (Sigma Chem. St Louis Mo)

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar, provenientes del Bioterio *Claude Bernard* de la BUAP (Benemérita Universidad autónoma de Puebla). Se seleccionaron al azar para cada grupo de tratamiento con un peso promedio de 120 a 170 g. Los sujetos experimentales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura y humedad (18-23 °C y 50-60 %, respectivamente), ciclo de luz-oscuridad de 12/12 h y con libre acceso a agua y alimento.

Se seleccionaron individuos macho al azar para cada grupo de tratamiento. Los sujetos experimentales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura y humedad (18-23 °C y 50-60, respectivamente), ciclo de luz-oscuridad de 12/12 h y con libre acceso de agua y alimento.

Los sujetos fueron anestesiados por medio de una inyección de hidrato de cloral por vía intraperitoneal, se colocaron en el aparato estereotáxico y se les realizó una incisión anteroposterior sobre el cráneo, con la ayuda de un algodón se removió el periostio. Se utilizaron coordenadas descritas por Paxinos (1997) y referencias obtenidas de experiencias anteriores.

Las coordenadas para el hipocampo fueron: anteroposterior  $-1.5$ ; lateralidad  $2.3$  respecto a bregma y profundidad de  $-2.0$  respecto a la duramadre.

Ya teniendo localizadas las coordenadas, se depositó la fracción 25-35 del péptido A $\beta$  o  $1\mu$ L de solución salina isotónica según correspondía al grupo en el hipocampo derecho de las ratas.

Una vez realizada la administración, los sujetos experimentales fueron regresados a sus jaulas hasta el sacrificio (que se realizó por medio de la guillotina) después de 8 o 24 h.

✓ Buffer de fosfatos, pH 7.4 2X (PBS)

Reactivos:

NaCl.....17.6 g

KCl.....8 g

Ácido clorhídrico

Solución A

Fosfato monosódico  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  .....13.8 g

Disolver en 250 ml de agua destilada

Solución B

Fosfato disódico  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .....56.8 g

Disolver en 1 L de agua destilada

Mezclar 190 mL de la solución A, con 810 ml de la solución B.

Adicionar 17.6 g de cloruro de sodio (NaCl), y 8 g de cloruro de potasio (KCl)

Ajustar a pH 7.4 con ácido clorhídrico diluido.

Se obtiene una solución concentrada 2X, que se debe diluir con agua destilada antes de usar en proporción 1:1

✓ Paraformaldehído al 4 % en buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7.4

Reactivos:

Buffer de fosfatos pH 7.4.....200 mL

Paraformaldehído .....8g

Diluir el buffer de fosfatos 1:1 v/v con agua desionizada para obtener una solución de 0.1 M y a un pH de 7.4.

Pesar 8 g de paraformaldehído y mezclarlo en un volumen inferior a 100 mL de agua desionizada, calentarlo en una parrilla con agitación hasta que alcance una temperatura de 55-60°C (cuidar que no exceda los 60°C). Una vez que alcance esta temperatura agregar unas gotas de NaOH 1N y esperar a que se disuelva por completo el paraformaldehído (se obtiene una solución transparente).

Esperar a que se enfríe la solución a temperatura ambiente. Una vez frío se filtra la solución con papel filtro. Mezclar y aforar a 200 mL con buffer de fosfatos pH 7.4.

Nota: trabajar en campana de extracción.

✓ Solución de silano, adherente para tejidos (Sigma Chem. St Louis Mo.)

Reactivos:

Silano.....2 ml

Acetona .....98 ml

Procedimiento:

Lavar los portaobjetos con detergente de pH neutro, enjuagarlos con agua destilada y dejarlos secar completamente.

Fueron sumergidos en la solución de silano al 2 % en acetona, durante 2 min y sumergirlos en agua destilada dos veces, dos min cada vez. Se dejaron secar completamente a temperatura ambiente o en estufa.

La solución de silano debe almacenarse en refrigeración, a 4°C. Puede volver a utilizarse siempre que su transparencia no cambie a color amarillo o rojizo.

✓ Técnica histológica:

Reactivos:

Paraformaldehído al 4 % en buffer de fosfatos

Etanol a las siguientes concentraciones 70, 80, 96 y 100 %

Mezcla etanol-Xilol 1:1

Xilol absoluto

Parafina

Procedimiento:

Sumergir los tejidos en el paraformaldehído y mantenerlos a 4°C hasta su posterior tratamiento.

Sumergir los tejidos durante 3 min en cada una de las concentraciones de etanol y después en la mezcla etanol-xilol, sumergir en 2 recipientes diferentes con xilol absoluto durante 3 y 10 min.

Fundir la parafina en una estufa y sumergir los tejidos el tiempo suficiente.

Retirar los tejidos de la parafina y colocarlos en un molde y enseguida verter parafina derretida.

Cortar con el micrótopo al grosor requerido.

✓ Técnica de inmunohistoquímica

1. Marcaje de laminillas con lápiz de diamante de acuerdo al tipo de anticuerpo a utilizar
2. Desparafinado y rehidratación de los cortes del tejido  
Colocar las laminillas en una canastilla de vidrio y sumergirla en los siguientes reactivos:  
Xilol por 10 min  
Xilol por 10 min  
Xilol/Alcohol 100 % (1:1) por 5 min  
Alcohol 100 % por 3 min  
Alcohol 100 % por 3 min  
Alcohol 96 % por 3 min  
Alcohol 96 % por 3 min  
Agua (no más de 3 min).
3. Enjuague con agua corriente.
4. Lavado con PBS 0.1 M, pH 7.4 durante 5 min (2 veces).
5. Eliminación de peroxidasa endógena  
Colocar las laminillas en un recipiente de coplin  
Colocar 50mL de una solución al 3 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Dejar en solución durante 10 min.
6. Lavado con PBS 0.1 M, pH 7.4 durante 5 min (2 veces)
7. Inmersión en solución de albúmina al 2 % en PBS (libre de IgG)  
Sacudir y secar rápidamente las laminillas, especialmente alrededor de la muestra  
Marcar con plumón de tinta hidrofóbica alrededor de la muestra  
Colocar las laminillas dentro de una cámara húmeda  
Colocar 150 µL de albúmina al 2 % por cada corte, cubriendo la muestra hasta los bordes internos del marcador  
Dejar 30 min en la cámara húmeda cerrada.
8. Lavado con PBS 0.1 M, pH 7.4 durante 5 min (2 veces)
9. Inmersión en solución de Tritón 0.2 % en PBS  
Colocar 150 µL de la solución de tritón en PBS sobre cada muestra  
Dejar 10 min en la cámara húmeda.
10. Lavado con PBS 0.1 M, pH 7.4 durante 5 min (2 veces)
11. Incubación con el anticuerpo primario  
Sacudir y secar rápidamente las laminillas, especialmente alrededor del corte  
Colocar 150 µL del anticuerpo primario diluido por cada corte  
Colocar en cámara húmeda cerrada  
Tiempo de reacción: 2 h a temperatura ambiente o toda la noche en refrigeración.
12. Lavado con PBS 0.1 M, pH 7.4 durante 5 min (2 veces)
13. Incubación del anticuerpo secundario biotinilado

Sacudir y secar rápidamente las laminillas, especialmente alrededor del corte  
Colocar 150 µL del anticuerpo sobre cada corte. Se usa un KIT (MULTILINK BIOTILINADO, Dako Co. Carpintería, Ca)  
Colocar en cámara húmeda cerrada  
Tiempo de reacción: 1 h a temperatura ambiente.

14. Lavado con PBS 0.1 M pH 7.4 durante 5 min (2 veces)

15. Incubación con Streptavidina HRP (Dako Co. Carpintería, Ca). conjugada a peroxidasa, (reconoce la biotina)

Colocar 150 µL del reactivo sobre cada corte. Se usa un KIT

Colocar en cámara húmeda cerrada

Tiempo de reacción: 30 min a temperatura ambiente.

16. Lavado con PBS 0.1 M, pH 7.4 durante 5 min (2 veces)

17. Revelado con DAB

Colocar 150 µL del reactivo preparado sobre cada corte (se usa un KIT) por aproximadamente 1 minuto

Observar el vire de color del tejido a un color marrón muy claro (el tiempo de reacción varía según el tipo de tejido, así que es necesario estar muy atento a los cambios de color y detener la reacción a tiempo)

Sumergir las laminillas en una canastilla con agua para detener la reacción

Desechar la DAB sobrante y todo el material que estuvo en contacto con este reactivo.

18. Lavar las laminillas con agua corriente durante 5 min

19. Tinción de laminillas

Colocar las laminillas en un recipiente de coplin para tren de tinción y sumergir en hematoxilina de Gill (aproximadamente 50 seg).

Contraste de núcleos con hematoxilina de Gill, inmersión de sólo 50 seg.

20. Enjuagar con agua corriente dentro de otro recipiente de coplin limpio (2 veces).

21. Deshidratación y montaje de las preparaciones

Sumergir las laminillas en los siguientes reactivos:

Alcohol 96 % por 3 min

Alcohol 96 % por 3 min

Alcohol al 100 % por 3 min

Alcohol al 100 % por 3 min

Xilol/Alcohol 100 % (1:1) por 5 min

Xilol por 10 min

Xilol por 10 min

Secar laminillas y colocar una gotas de resina permanente polymount (Polysciences, Inc. USA) en el centro del corte

Colocar un cubreobjetos y limpiar el exceso de resina con Xilol.

✓ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 %

Colocar 5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % y 45 mL de agua destilada.

✓ Albúmina 2 % en PBS

Reactivos:

Albúmina sérica bovina (Sigma Chem. St Louis Mo.).....0.02 g

PBS..... 1 mL

Procedimiento:

Pesar la albúmina y colocarla en un Eppendorf de 1 mL

Colocar 1 mL de PBS y mezclar (evitar que se haga espuma)

✓ Tritón 0.2 % en PBS

Reactivos:

Tritón x-100 ( t-Octyphenoxipolyethoxiethanol) (Sigma Chem. St Louis Mo)..... 100 µL

( detergente que elimina lípidos y desechos)

PBS..... 50 mL

Procedimiento:

Agregar al PBS el tritón que debido a su densidad debe ser tomado lentamente

Mezclar pipeteando varias veces

✓ Revelador de DAB (Diaminobencidina. Dako Co. Carpintería, Ca).

Se utiliza un KIT que se prepara de la siguiente forma:

1 mL de buffer por cada gota de reactivo y mezclar

Después de utilizar, desechar la DAB y todo el material que estuvo en contacto con el reactivo, en una solución concentrada de cloro para eliminar la actividad carcinogénica.

Nota: utilizar guantes y doble cubrebocas para evitar el contacto con la DAB.

✓ Anticuerpo primario (dilución)

Se requieren 150 µL de la dilución por cada corte y se emplearon diluciones 1:100 en PBS

Poner 1.5 µL de anticuerpo más 148.5 µL de PBS

Multiplicar por la cantidad de cortes a trabajar

✓ Hematoxilina de Harris

Reactivos:

Hematoxilina .....	0.5 g
Alcohol etílico absoluto .....	5 mL
Alumbre de amonio o potasio .....	10 g
Agua destilada .....	100 mL
Óxido rojo de mercurio .....	0.25 g

Procedimiento:

En un frasco disolver el alumbre en el agua y calentar. En otro frasco disolver la hematoxilina en alcohol. Retirar la solución de alumbre del calor y mezclar con la solución de hematoxilina en alcohol. Volver a calentar por un 1 min, dejar enfriar un poco y adicionar el óxido de mercurio lentamente. Calentar nuevamente hasta que la solución toma un color púrpura oscura. Retirarla de calor y dejar enfriar. Por cada 100 mL de solución agregar 1 mL de ácido acético. Antes de ser utilizada debe ser filtrada.

## GLOSARIO

**Amiloide- $\beta$ :** parte de la proteína APP encontrada en depósitos insolubles en las neuronas y que forma el núcleo de las placas seniles.

**Análisis histoquímico:** estudios estructurales y morfológicos de tejidos.

**Célula glial:** célula especializada que soporta, protege o nutre células nerviosas.

**Citoesqueleto:** red de fibras proteicas en el citoplasma de las células y que mantiene su estructura y forma, además se encarga de transportar sustancias en la célula.

**Demencia:** término referente a los síntomas asociados con la disminución de la función cognitiva y que interfiere con la vida y actividades cotidianas.

**Funciones cognitivas:** todos los aspectos del pensamiento consciente y de la actividad mental, incluyendo aprendizaje, percepción, toma de decisiones y memoria.

**Hipocampo:** parte del cerebro que desempeña un rol principal en la función del aprendizaje y la memoria y participa en convertir a la memoria a corto plazo en memoria a largo plazo.

**Metabolismo:** todos los procesos químicos que tienen lugar dentro de las células para degradar compuestos o producir compuestos complejos.

**Microtúbulos:** estructura de apoyo interna de las células que guía a los nutrientes y a las moléculas.

**Modelo animal:** animal experimental que se somete a algún procedimiento (inyección de alguna droga, mutaciones genéticas, etc) para inducir la enfermedad que se estudia, o un cuadro lo más parecido posible a ella. Así, estos animales pueden ser estudiados como un "modelo" de la enfermedad de interés.

**Mutación:** cambio inusual en el ADN de una célula que puede provocar una enfermedad.

**Neurotransmisor:** sustancia que funciona como mensajero químico entre las neuronas interviniendo en la producción de estímulos nerviosos en las uniones sinápticas.

**Marañas neurofibrilares:** depósitos de proteína tau hiperfosforilada que se encuentran en las neuronas de las personas que padecen el Alzheimer.

**Placas seniles:** depósitos insolubles extracelulares encontrados en el cerebro, constituidos principalmente por la proteína amiloide- $\beta$ .

**Radicales libres:** moléculas que contienen uno o más electrones sin aparear, por lo que son muy reactivas y en exceso pueden dañar los tejidos.

**Tau:** proteína componente principal de los filamentos helicoides pareados en marañas neurofibrilares.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alcaraz V y Guma E (2001) La memoria humana En: *Texto de Neurociencias cognitivas*. El Manual Moderno, México.
2. Amaral DG and Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571-591.
3. Amaral DG (1993) Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. *Curr Opin Neurobiol* 3:225-229.
4. Arrigo AP (2005) Chaperons moléculaires et repliement des protéines L'exemple de certaines protéines de choc thermique. *Medicine/Sciences* 21:619-25.
5. Auld DS, Kornecook T, Bastianetto S and Quirion R (2002) Alzheimer's Disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to  $\beta$ -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Progr Neurobiol* 68:209-245.
6. Ayala GX and Tapia R (2003) Expression of heat shock protein 70 induced by 4-aminopyridine through glutamate-mediated excitotoxic stress in rat hippocampus *in vivo*. *Neuropharmacology* 45:649-660.
7. Barral JM, Broadley SA, Schaffar G and Hartl F (2004) Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. *Semin Cell Dev Biol* 15:17-29.
8. Barranco-Quintana JL, Allam MF, Del Castillo AS, y Navajas R FC (2005) Factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol* 40:613-618.
9. Bastianetto S and Quirion R (2002) Natural extracts as possible protective agents of brain aging. *Neurobiol Aging* 23:891-897.
10. Becker J and Craig E (1994) Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem* 15-219:11-23.
11. Bukau B and Horwich A (1998) The HSP 70 and HSP 60 Chaperone machines. *Cell* 92:351-366.
12. Buriel C, Mezger V, Pinto M, Rallu M, Trigon S and Morange M (1992) Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experientia* 48:629-634.
13. Butterfield DA, Drake J, Pocernich C and Castegna A (2001) Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid  $\beta$ -peptide. *Trends Mol Med* 7:548-554.
14. Butterfield D, Castegna A, Lauderback C and Drake J (2002) Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging* 23:655-664.

15. Butterfield D and Bush A (2004) Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide (1–42): involvement of methionine residue 35 in the oxidative stress and neurotoxicity properties of this peptide. *Neurobiol Aging* 25:563–568.
16. Butterfield D and Boyd-Kimball D (2005) The critical role of methionine 35 in Alzheimer's amyloid h-peptide (1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity. *Biochem Biophys Acta* 1703:149– 156.
17. Caplan AJ (1999) Hsp90's secrets unfold: new insights from structural and functional studies. *Trends Cell Biol* 9:262-268.
18. Carpio A (2000) Alternativas terapéuticas de la Enfermedad de Alzheimer. *Rev Ecuat Neurol* 9:36-43.
19. Cisse S, Perry G, Lacoste-Royal G, Cabana T and Gauvreau D (1993) Immunochemical identification of ubiquitin and heat-shock proteins in corpora amylacea from normal aged and Alzheimer's disease brains. *Acta Neuropathol* 85:233-240.
20. Craig EA (1993) Chaperones: helpers along the pathways to protein folding. *Science* 260:1902-1903.
21. Craig EA, Weissman JS and Horwich AL (1994) Heat Shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell* 78:365-372.
22. Cruz L, Urbanc B, Buldyrev SV, Christie R, Gómez-Isla T, Havlin S, Mcnamara M, Stanley HE, and Hymán BT (1997) Aggregation and disaggregation of senile plaques in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 7612–7616.
23. Cuevas E (2003) Efecto de la administración de la fracción 25-35 de la Amiloide- $\beta$  en rata neonata sobre la morfología en el hipocampo y el aprendizaje y la memoria espacial en rata adulta. Tesis de licenciatura QFB BUAP.
24. Chen S-Y, Wright JW and Barnes CD (1996) The neurochemical and behavioral effects of  $\beta$ -amyloid peptide ( 25-35). *Brain Res* 720:54-60.
25. Chong Z Z, Li F and Maiese K (2005) Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol* 75:207–246.
26. Delobette S, Privat A and Tangui M, (1997) *In vitro* aggregation facilitates  $\beta$ -amyloid peptide- 25–35 –induced amnesia in the rat. *Eur J Pharm* 319:1–4.

27. Desmond J E and Moore J W (1982) A brain stem region essential for the classically conditioned but not unconditioned nictitating membrane response. *Physiol Behav* 28:1029-1033.
28. Donati Y, Slosman D and Polla B (1990) Oxidative injury and the heat shock response. *Biochem Pharmacol* 40:2571-2577.
29. Donoso A. (2003) La enfermedad de Alzheimer. *Rev Chil neuropsiquiatría* 41:13-22.
30. Dou F, Netzer W., Tanemura K, Li F, Hartl F, Takashima A, Gouras G, Greengard P and Xu H (2003) Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *Proced Natl Acad Sci USA* 100:721-726.
31. Edelstein-Keshet L and Spiros A (2002) Exploring the formation of Alzheimer's disease senile plaques in silico. *J Theor. Biol* 216:301–326.
32. Eichenbaum H. (2003) How does the hippocampus contribute to memory? *Trends Cogn Sci* 7:427-429.
33. Eichenbaum H. (2004) Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 44:109–120.
34. Ellis R and Hartl F (1996) Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function. *FASEB J* 10:20-26.
35. Espinosa B, Zenteno R, Mena R, Robitaille Y, Zenteno E and Guevara J (2001) O-Glycosylation in Sprouting Neurons in Alzheimer Disease, Indicating Reactive Plasticity. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:441-448.
36. Feder M (1999) Heat shock proteins, molecular chaperones and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61:243-282.
37. Feige U and Polla B (1994) HSP 70 a multigene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia* 50:979-986.
38. Fernández E. (1996) Neurobiología básica de la formación hipocámpica. *Rev Neurol* 24:779-784.
39. Fernández J y López JC (1998) La neuropsicología de la memoria. *Ciencias* 49:18-25.
40. Fink A (1999) Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* 79:425-449.
41. Frautschy S, Baird A and Cole G. (1991) Effects of injected Alzheimer  $\beta$ -amyloid cores in rat brain. *Proc Nat Acad Sci USA* 88:8362-8366.
42. Fuentes P. (2003) Enfermedad de Alzheimer: una nota histórica. *Rev Chil Neuropsiquiatría* 41:9-12

43. Gavilán MP, Vela J, Castaño A, Ramos B, del Río JC, Vitorica J and Ruano D (2006) Cellular environment facilitates protein accumulation in aged rat hippocampus. *Neurobiol Aging* 27:973–982.
44. Gazulla J, Cavero-Nagore M. (2006) Glutamato y enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol* 42:427-432.
45. Götz J, Schild A, Hoerndli F and Pennanen L (2004) Amyloid-induced neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease: insight from transgenic mouse and tissue-culture models. *Int J Dev Neurosci* 22:453–465.
46. Graeber M. (1999) No man alone: The rediscovery of Alois Alzheimer's original cases. *Brain Pathol* 9:237-240.
47. Grau-Veciana JM (2006) Tratamiento de los síntomas no cognitivos de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol* 42:482-488.
48. Guimerà A, Jirones X, Cruz-Sánchez F. (2002) Actualización sobre la patología de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Esp Patol* 35:21-48.
49. Hamos J, Oblas B, Pulaski-Salo D, Welch W, Bole D and Drachman D (1991) Expression of heat-shock proteins in Alzheimer's disease. *Neurology* 41:345-350.
50. Harboe M and Quayle A (1991) Heat shock proteins: friend or foe? *Clin Exp Immunol* 86:2-5.
51. Hartl F (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381:571-579.
52. Hass I (1995) Protein-mediated protein maturation in eukaryotes. *FEBS Lett* 369:72-75.
53. Imaizumi K, Miyoshi K, Katayama T, Yoneda T, Takashi Kudo T and Tohyama M. (2001) The unfolded protein response and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1536:85-96.
54. Jaattela M and Wissing D (1992) Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. *Ann Med* 24:249-258.
55. Jakob U and Buchner J (1994) Assisting spontaneity: the role of HSP 90 and small HSPs as molecular chaperones. *Trends Biochem Sci* 19:205-211.
56. Jiménez FJ, Alonso H, Ayuso L y Jabbour T (2006) Estrés oxidativo y enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol* 42:419-427.
57. Joseph J, Shukitt-Hale B, Denisovaa NA, Martina A, Perry G and Smith MA (2001) Copernicus revisited: amyloid beta in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22:131–146.

58. Kar S, Slowikowski S, Westaway D, and Mount HT (2004) Interactions between  $\beta$ -amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatr Neurosci* 29:427-441.
59. Kopeček P, Altmannová K and Weigl E (2001) Stress proteins: nomenclature, division and functions. *Biomed Papers* 145:39–47.
60. Kowall NW, Beal MF, Busciglio J, Duffy LK and Yankner BA (1991) An *in vivo* model for the neurodegenerative effects of  $\beta$ -amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7247-7251.
61. Latchman DS (2004) Protective effect of heat shock proteins in the nervous system. *Curr Neurovasc Res* 1:21-27.
62. Lebeau M and Baulieu E (1994) Steroid agonists and receptor-associated proteins. *Hum Reprod* 9:437-444.
63. Lee S, Carson K, Rice-Ficht A and Good T (2006) Small heat shock proteins differentially affect A $\beta$  aggregation and toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 347:527–533.
64. Lindquist S and Craig E (1988) The heat shock proteins. *Annu Rev Genet* 22:631-677.
65. Macario AJ and Conway de Macario E (2002) Sick chaperones and ageing: a perspective. *Ageing Res Rev* 1:295-311.
66. Magrané J, Smith RC, Walsh K and Querfurth W (2004) Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed  $\beta$ -Amyloid in neurons. *J Neurosci* 24:1700-1706.
67. Manzano-Palomo S, De la Morena-Vicente MA, Barquero MS (2006) Neurotransmisores en la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol* 42:350-353.
68. Marder K and Sano M. (2000) Estrogen to treat Alzheimer's disease: Too little, too late? *Neurology* 54:2035-2037.
69. Martin J and Hartl F (1997) Chaperone-assisted protein folding. *Curr Opin Struct Biol* 7:41-52.
70. Martínez J y Pascual L (2003) *Alzheimer 2003:¿qué hay de nuevo?* Aula Médica Madrid, España.
71. Menéndez S, Padrón N y Llibre J (2002) Péptido beta amiloide, proteína tau y enfermedad de Alzheimer. *Revista Cubana de Investigación Biomedica* 21:253-61

72. Michels A, Kanon B, Konings A, Ohtsuka K, Bensaude O and Kampinga H (1997) HSP70 and HSP40 chaperone activities in the cytoplasm and the nucleus of mammalian cells. *J Biol Chem* 272:33283-33289.
73. Miranda S, Opazo C, Larrondo LF, Muñoz F, Ruiz F, Leighton F and Inestrosa NC (2000) The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid  $\beta$ -peptide in Alzheimer's disease. *Progress Neurobiol* 62:633-648.
74. Monji A, Utsumi H, Ueda T, Taiji Imoto T, Ichiro Yoshida I, Hashioka S, Tashiro K and Tashiro N (2002) Amyloid- $\beta$  -protein (A $\beta$ ) (25–35)-associated free radical generation is strongly influenced by the aggregational state of the peptides. *Life Sci* 70:833–841.
75. Morgan C, Colombres M, Nuñez MT and Inestrosa NC (2004) Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 74:323–349.
76. Morimoto R. (1999) Regulation of heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12:3788-3796.
77. Muchowski P (2002) Protein misfolding, amyloid formation, and neurodegeneration: a critical role for molecular Chaperones? *Neuron* 35:9-12.
78. Muñoz F (2001) El péptido  $\beta$ -amiloide: mecanismos de neurotoxicidad. Neuroprotección por antioxidantes y estrógenos. *Revista Española de Geriátria y Gerontología* 36:109-116.
79. Ohtsuka K and Suzuki T (2000) Roles of molecular chaperones in the nervous system. *Brain Res Bull* 53:141–146.
80. Organización Mundial de la Salud. CIE10 (1992) *Trastornos mentales y del comportamiento*. Meditor, España.
81. Ostrosky F (1998) Cuando la memoria falla. *Ciencias* 49:30-35.
82. Palleros D, Shi L, Reid K and Fink A (1994) HSP 70-protein complexes. Complex stability and conformation of bound substrate protein. *J Biol Chem* 269 13107-13114.
83. Papp E, Nardai G, Söti C and Csermely P (2003) Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis. *Biofactors* 17:249-257.
84. Passig C. (1994) Los sistemas de memoria. *Revista de Psicología* 5:27-34.
85. Pérez N, Sugar J, Charya S, Jonson G, Merrill C, Bierer L, Perl D, Haroutunian V and Wallace W (1991). Increased synthesis and accumulation of heat-shock 70 proteins in Alzheimer's disease. *Mol Brain Res* 11:249-254.
86. Peters J (1994) Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem Sci* 19:377-382.

87. Prado RA (1998) ¿En dónde se encuentra la memoria? *Ciencias* 49 26-28.
88. Praticò D and Delanty N (2000) Oxidative injury in diseases of the central nervous system: Focus on Alzheimer's disease. *Amer J Med* 109:577-585.
89. Ranson NA, White HE and Saibil HR (1998) Chaperonins. *Biochem J* 333:233-242.
90. Renkawek K, Bosman G and Gastel M (1993) Increased expresión of heat-shock protein 27 KDa in Alzheimer disease: a preliminary study. *Neuroreport* 5:14-16.
91. Řípová D and Strunecká A (2001) An ideal biological marker of Alzheimer's disease: Dream or reality? *Physiol Res* 50:119-129.
92. Ritossa F (1962) New puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18:571-573.
93. Selkoe D, Schenk D. (2003) Alzheimer's disease: Molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:545–84.
94. Sharp FR (1999) Heat-shock protein protection. *TINS* 22:97-99.
95. Sherman MY and Goldberg AL (2001) Cellular defenses against unfolded proteins: A cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29:15–32.
96. Sigler P, Xu Z, Rye H, Burston S, Fenton W and Horowich A (1998) Structure and function in GroEL-mediated protein folding. *Annu Rev Biochem* 67:581-608.
97. Skodras G, Peng JH, Parker JC, and Kragel PJ (1993) Immunohistochemical localization of amyloid beta-protein deposits in extracerebral tissues of patients with Alzheimer's disease. *Ann Clin Lab Sci* 23:275-280.
98. Söti C and Csermely P (2002) Chaperones and aging: role in neurodegeneration and in other civilizational diseases. *Neurochem Int* 41:383–389.
99. Soto JL (2002) Las enfermedades neurológicas. *Gaceta Médica de México* 138:536-540.
100. Srinivas U and Swamynathan S (1996) Role of heat shock transcription factors in stress response and during development. *J Biosci* 21:103-121.
101. Stepanichev MY, Moiseeva YV, Lazareva NA, Onufriev MV and Gulyaeva NV (2003) Single intracerebroventricular administration of amyloid-beta (25–35) peptide induces impairment in short-term rather than long-term memory in rats. *Brain Res Bulletin* 61:197–205.
102. Stepanichev MY, Zdobnova IM, Zarubenko I, Moiseeva YV, Lazareva NA, Onufriev MV and Gulyaeva NV (2004) Amyloid- $\beta$ (25–35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus. *Physiol Behav* 80:647– 655.

103. Tanzi R and Bertram L (2005) Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: A genetic perspective. *Cell* 120:545–555.
104. Tissieres A, Mitchell H and Tracey U (1974) Protein synthesis in salivary glands of *D melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84:389-398.
105. Valpuesta JM, Llorca O y Marco S (2000) Biología de las chaperoninas. *Investigación y ciencia* 282:1-14.
106. Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M and Butterfield D (2000) Review: Alzheimer's amyloid- $\beta$  peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol* 130:184–208.
107. Von Bernhardt R (2005) Mecanismos neurobiológicos de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Chilena de neuropsiquiatría* 43:23-132.
108. Walsh DM and Selkoe D (2004) Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44:181–193.
109. Welch W and Gambetti P (1998) Chaperoning brain diseases. *Nature* 392:23-24.
110. Wiech H, Buchner J, Zimmermann R and Jakob U (1992) HSP 90 chaperones protein folding *in vivo*. *Nature* 358:169-170.
111. Wilhelmus MM, Boelens WC, Otte-Höllerb I, Kamps B, de Waal RM and Verbeek M (2006) Small heat shock proteins inhibit amyloid- $\beta$  protein aggregation and cerebrovascular amyloid- $\beta$  protein toxicity. *Brain Res* 1089:67-78.
112. Wirth D, Gustin P, Drion PV, Dessy-Doize C y Christian ES (2002) Les protéines de choc thermique (heat shock proteins). Classification, structure, fonctions et implications dans les processus pathologiques. *Ann Méd Vet* 146:201-216.
113. Wirths O, Multhaup G and Bayer TA. (2004) A modified b-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the  $\beta$ -amyloid peptide the first step of a fatal cascade. *Neurochem* 91:513–520.

Páginas de internet consultadas:

- [www.fundacionalzheimeresp.org](http://www.fundacionalzheimeresp.org)
- [www.alzheimers.org](http://www.alzheimers.org)
- <http://hipocampo.org/alzheimer.htm>

## **ABREVIATURAS**

HSP	Heat Shock proteins (proteínas de choque térmico)
EA	Enfermedad de Alzheimer
KDa	Kilodaltones
A $\beta$	Amiloide- $\beta$
APP	Amiloid $\beta$ -protein precursor (proteína precursora del amiloide- $\beta$ )
Apo E	Apolipoproteína E
SSI	Solución salina isotónica
PNs	Placas neuríticas
MNFs	Marañas neurofibrilares
OMS	Organización Mundial de la Salud
PS	Presenilina
PHFs	Parejas de Filamentos Helicoidales apareados